



L'hyperthermie provoque l'agrégation de FLIP et restaure l'apoptose induite par TRAIL

Aymeric Morle

► To cite this version:

Aymeric Morle. L'hyperthermie provoque l'agrégation de FLIP et restaure l'apoptose induite par TRAIL. Médecine humaine et pathologie. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DI-JOS082 . tel-01292139

HAL Id: tel-01292139

<https://theses.hal.science/tel-01292139>

Submitted on 22 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences de la vie

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement le 17 décembre 2014 par :

Aymeric MORLÉ

L'hyperthermie provoque l'agrégation de FLIP et restaure l'apoptose induite par TRAIL

Directeur de thèse :
Olivier MICHEAU

Chef d'équipe :
Carmen GARRIDO

Membres du jury :
Pr Jean-Louis CONNAT
Pr Patrick ARRIGO
Dr Marie-Thérèse DIMANCHE-BOITREL
Pr Bruno SÉGUI
Dr Thierry GUILLAUMEUX

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de prendre sur leur temps afin d'évaluer mon travail de thèse.

Patrick ARRIGO, Professeur de Classe Exeptionnelle à l'INSERM UMR 1052, centre de recherche en cancérologie de Lyon.

Marie thérèse Dimanche-boitrel, Directeur de Recherche à l'INSERM, Institut de recherches en Santé, Environnement et Travail, à l'Université de Rennes.

Bruno SÉGUI, Professeur des Université à l'INSERM UMR 1037, Cancéropole du Grand Sud-Ouest, à Toulouse.

Thierry GUILLAUDEUX, Maître de conférence à l'unité INSERM UMR 917 « Microenvironnement et Cancer », à l'Université de Rennes.

Je remercie le ministère de la recherche ainsi que tous les donateurs de la Ligue Nationale Contre le Cancer, qui permettent de faire avancer la science et sans qui le financement et la réalisation de cette thèse n'auraient pas été possible.

Je tiens a remercier en particulier mon directeur de thèse, Olivier MICHEAU, qui m'a accompagné dans l'univers de la recherche et tout au long de ce projet. Je lui témoigne ma reconnaissance pour m'avoir accordé sa confiance, ainsi que pour m'avoir laissé une certaine indépendance tout en m'appuyant de ses grandes qualités scientifiques.

Je remercie Carmen GARRIDO, pour m'avoir acceptée au sein de son laboratoire et de son équipe, je lui témoigne ma reconnaissance pour ses conseils et son dynamisme.

Je remercie les membres de mon équipe, Florent, Sarah, Thibault, Sofiane, Hakima et les plus anciens Alex, Guillaume, Nij et Lisa. Merci aux membres de l'unité et à toutes les personnes qui m'ont aidées et accompagnées au fil des années.

Enfin je remercie spécialement les personnes qui ont contribué indirectement à ce projet par leurs conseils et leur aide au jour le jour : Margaux, Jessica, Arlette, Emeric et ceux que j'ai oublié.

Résumé

TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) est une protéine du système immunitaire appartenant à la famille du TNF (*Tumor necrosis factor*). L'intérêt de TRAIL en thérapie anti-cancéreuse réside dans sa capacité à induire la mort par apoptose des cellules tumorales, sans exercer de toxicité envers les cellules saines. Le principal frein à l'utilisation de TRAIL est la survenue courante de résistances dans les tumeurs, limitant ainsi son efficacité. Mon travail de thèse a consisté à étudier l'intérêt de l'hyperthermie (ou choc thermique) en tant qu'adjuvant à TRAIL et à décrire ses capacités à contourner les mécanismes de résistance.

Dans un premier temps, l'activité et la portée de cette combinaison a été évaluée dans de nombreuses et diverses lignées cellulaires cancéreuses sensibles ou résistantes à TRAIL. Un choc thermique (1h 42°C) permet de sensibiliser efficacement les lignées devenues résistantes à TRAIL et cette association s'est avérée efficace dans toutes les lignées testées.

Dans un deuxième temps, mon travail s'est focalisé sur les mécanismes induits par l'hyperthermie, responsables de la sensibilisation et de l'apoptose des cellules. Les analyses des complexes initiateurs de la mort (DISC - *Death-inducing signaling complex*) ont révélé de nombreuses disparités suivant les conditions thermiques. Les différences majeures impliquent avant tout l'absence de FLIP dans le DISC, celui-ci étant l'inhibiteur principal de la voie, ainsi qu'un retard de la formation du complexe en condition d'hyperthermie. Ceci est associé à l'activation des caspases initiateuses d'une meilleure qualité, une fois la température revenue à la normale.

L'absence de FLIP est expliquée par son inactivation due à l'agrégation de cette protéine suite à l'augmentation de la température. Ce phénomène est indépendant d'une quelconque modification post-traductionnelle connue, mais peut être inhibé par la présence de glycérol qui stabilise les protéines dénaturées.

L'ensemble de ce travail met en lumière l'intérêt de la combinaison de TRAIL avec une hyperthermie et présente un point de vue nouveau sur les mécanismes expliquant son efficacité.

Mots clés : Cancer, apoptose, TRAIL, hyperthermie, FLIP, agrégation

Abstract

The TNF-family member TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) is a cytokine involved in the immune anti-tumour surveillance. TRAIL is a promising agent currently under investigation for its anti-cancer properties with limited side effects on healthy cells. However, the use of TRAIL in oncology has been limited due to its lack of efficiency, mainly associated with cell resistance to apoptosis. The aim of this project was to study the interest of hyperthermia (or heat shock - HS) as an adjuvant for TRAIL therapy and the mechanisms involved in this sensitization.

We have first evaluated the significance of this combination in a large variety of cancer cell lines known to be sensitive or resistant to TRAIL. We could demonstrate that hyperthermia was able to efficiently sensitize resistant cancer cells to TRAIL-induced apoptosis in almost every cell lines tested.

We next, focused our work on the molecular mechanisms responsible for the sensitization, during hyperthermia. Analyses of the DISC (Death-Inducing Signaling Complex) revealed a lack of recruitment of FLIP in the DISC, the main inhibitor of the extrinsic pathway, and a delay in the formation of the complex under hyperthermic conditions. Inhibition of FLIP recruitment was associated with enhanced initiator caspases activation when cells were reincubated at 37°C after the HS.

The absence of FLIP within the TRAIL DISC was due to its aggregation during HS and was independent of post-translational modifications. Inhibition of FLIP aggregation by glycerol, which stabilizes denaturated proteins, restored FLIP recruitment within the TRAIL DISC and consequently inhibited TRAIL-induced cell death.

Taken together, these results highlight the interest of combining TRAIL with hyperthermia and highlight new mechanisms explaining its efficiency.

Keywords : Cancer, apoptosis, TRAIL, hyperthermia, FLIP, aggregation

Sommaire

Remerciements	3
Résumé / Abstract	5
Sommaire	7
Liste des abréviations	9
Liste des figures	11
Liste des tableaux	12
Avant propos	13
I. Le cancer et la cancérogenèse	15
II. Les causes et les facteurs à risque	17
III. Les traitements existants	20
IV. La mort cellulaire programmée	23
Introduction bibliographique	25
I. TRAIL - un membre de la famille du TNF	27
1. <i>L'exécution de l'apoptose</i>	27
A. <u>Les caspases - les clés de l'apoptose</u>	29
B. <u>Le processus apoptotique</u>	30
2. <i>La fonction biologique de TRAIL</i>	31
A. <u>Les cellules exprimant TRAIL et ses récepteurs</u>	32
B. <u>Le rôle physiologique de TRAIL</u>	32
a) <i>TRAIL, une cytokine anticancéreuse</i>	33
b) <i>Un régulateur de l'immunité</i>	34
3. <i>TRAIL et ses récepteurs</i>	35
A. <u>Structure de TRAIL</u>	35
B. <u>Les récepteurs agonistes</u>	37
C. <u>Les récepteurs antagonistes</u>	38
4. <i>La signalisation apoptotique induite par TRAIL</i>	39
A. <u>Apoptose extrinsèque - La voie principale de TRAIL</u>	39
B. <u>Apoptose intrinsèque - La boucle d'amplification mitochondriale</u>	42
C. <u>Les régulations de la voie intrinsèque</u>	45
a) <i>FLIP - Un inhibiteur majeur de la voie extrinsèque.</i>	45
b) <i>Les autres régulateurs directs de la voie extrinsèque.</i>	48
c) <i>Les régulations de la voie intrinsèque</i>	51
5. <i>Utilisation de TRAIL en thérapie</i>	53
A. <u>Les formes recombinantes de TRAIL</u>	53
a) <i>Les versions classiques</i>	54
b) <i>Les versions taggées</i>	54
B. <u>Les anticorps agonistes</u>	54
C. <u>Les autres formes de TRAIL</u>	55
II. Les protéines de choc thermique (HSP) - Classification et fonctions	57
1. <i>Les HSP dans la réponse au stress</i>	57
2. <i>La famille des petites protéines de stress (sHSP) - HSP27</i>	59
A. <u>Structure, modifications et oligomérisation d'HSP27</u>	59
B. <u>Stress et fonctions apoptotiques</u>	60
3. <i>La famille d'HSP70</i>	61

A. <u>Structure d'HSP70</u>	63
B. <u>Stress et fonctions anti-apoptotiques</u>	63
4. La famille d'HSP90	65
A. <u>Structure d'HSP90</u>	65
B. <u>Stress et fonctions anti-apoptotiques</u>	66
III. L'hyperthermie	69
1. Les effets cellulaires d'un choc thermique	69
A. <u>Les effets d'un choc thermique sur l'agrégation protéique</u>	69
a) <i>Structure, conformation et repliement des protéines</i>	69
b) <i>La dénaturation et la formation d'agrégats protéiques</i>	71
c) <i>L'agrésome</i>	75
B. <u>Le système de dégradation ubiquitine/protéasome</u>	77
a) <i>Ubiquitination</i>	77
b) <i>Dégradation protéasomale</i>	78
C. <u>Les modifications structurales</u>	79
a) <i>La fluidité membranaire</i>	79
b) <i>Le cytosquelette</i>	80
c) <i>Au niveau nucléaire</i>	80
D. <u>La réponse moléculaire au stress thermique</u>	81
2. L'hyperthermie contre le cancer	83
A. <u>L'hyperthermie en combinaison avec TRAIL</u>	84
B. <u>L'hyperthermie en combinaison avec la radiothérapie</u>	85
C. <u>L'hyperthermie en combinaison avec la chimiothérapie</u>	85
3. Les moyens techniques d'induire une hyperthermie	87
Objectifs	91
Résultats	93
I. L'hyperthermie restaure la sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL de manière indépendante de la voie mitochondriale	95
II. La sensibilisation à TRAIL par un choc thermique est dépendante de l'agrégation de FLIP	109
III. Les protéines de choc thermique ont un rôle mineur dans l'agrégation de FLIP et dans l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique	125
IV. TRAIL-R1 et TRAIL-R2 sont différenciellement impliqués dans l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique	135
Discussion	141
Conclusion générale	159
Matériel et méthode	161
Annexe	169
- Curriculum Vitae	
- Article 1 : Hyperthermia restores apoptosis induced by death receptors through aggregation-induced c-FLIP cytosolic depletion.	
- Article 2 : TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through AKT.	
Références	207

Liste des abréviations

A

Akt : *Activated protein kinase*
 Apaf-1 : *Apoptotic protease activating factor*

B

Bad : *Bcl-2 antagonist of cell death*
 Bag 3 : *BCL2-associated athanogene 3*
 Bak : *Bcl-2 antagonist killer 1*
 Bax : *Bcl-2 associated x protein*
 BCB : *Bax channel blockers*
 Bcl-2 : *B-cell lymphoma 2*
 Bcl-xL : *Bcl-2-related gene X, long isoform*
 BH : *Bcl-2 Homology*
 Bid : *BH3-interacting domain death agonist*
 Bik : *Bcl-2-interacting killer*
 Bim : *Bcl-2-interacting mediator of cell death*

C

CARD : *Caspase-recruitment domain*
 CRD : *Cystein-rich domain*
 CUL3 : *Cullin-3*

D

ATP : *Adénosine triphosphate*
 DcR : *Decoy Receptor*
 DD : *Death Domain*
 DED : *Death Effector Domain*
 DIABLO : *Direct IAP binding protein with low pI*
 DISC : *Death-Inducing Signaling Complex*
 DR : *Death Receptor*

E

ERK : *Extracellular signal-regulated kinase*

F

FADD : *Fas-Associated Death Domain*
 FLIP_{L/S/R} : *Cellular Flice inhibitory protein Long/Short/Raji*
 c-Fos : *Cellular FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*

G

GPI : *Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol*
 GSK-3 : *Glycogen synthase kinase-3*
 GRP : *Glucose-regulated protein*

H

HS : *Heat shock*
 HSP : *Heat shock protein*

I

IAP : *Inhibitors of Apoptosis Protein*
 IFN : *Interféron*
 Ig : *Immunoglobuline*
 IκB : *Inhibitor of NF-κB*

J

JNK : *c-Jun N-terminal Kinase*

L

LPS : *Lipo-Polysaccharide*

M

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
 Mcl-1 : *Myeloid cell leukemia 1*

N

NF-κB : *Nuclear factor Kappa-B*
 NK : *Natural Killer*

O

OPG : Ostéoprotégérine

P

PI3K : *Phosphoinositide triphosphate kinase*

PIP2 : *Phosphatidylinositol-4,5-*

PKC : Protein Kinase C

PLAD : *Pre-Ligand assembly domain*

R

RANK : *Receptor Activator of NF- κ B*

RANKL : *Receptor Activator of NF- κ B Ligand*

RIP : *Receptor Interacting Protein*

ROS: *Reactive oxygen species*

S

Smac : *Second mitochondrial activator of caspases*

T

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TNF-R : *TNF Receptor*

TRADD : *TNF receptor-associated death domain*

TRAF2: *TNF receptor-associated factor-2*

TRAIL : *TNF Related Apoptosis Inducing Ligand*

TRAIL-R : *TRAIL Receptor*

Liste des figures

Introduction bibliographique

Figure 1. Les caractéristiques essentielles des cancers	14
Figure 2. Les caractéristiques supplémentaires des cancers	14
Figure 3. Les stades de développement d'un cancer de l'utérus	19
Figure 4. La mort cellulaire - apoptose VS nécrose	22
Figure 5. Structure des caspases	28
Figure 6. Structure de TRAIL et de ses récepteurs	36
Figure 7. L'apoptose induite par TRAIL - voie extrinsèque et voie intrinsèque	40
Figure 8. Modèle de structure de la caspase-8 dans le DISC	42
Figure 9. Structure de FLIP	44
Figure 10. Modèle structural d'action de FLIP _L et de FLIP _S dans le DISC	44
Figure 11. Les régulateurs de la voie extrinsèque et de la voie intrinsèque	48
Figure 12. Structure des membres pro- et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2	50
Figure 13. Interactions entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2	50
Figure 14. Structure et oligomérisation d'HSP27	58
Figure 15. Structure d'HSP70	62
Figure 16. Structure d'HSP90	66
Figure 17. Réponse des tumeurs à l'hyperthermie	68
Figure 18. Statut énergétique des protéines suivant leur conformations et leur agrégation	70
Figure 19. Les étapes de la formation d'agrégats	72
Figure 20. Les étapes de la formation et de l'élimination d'un agrésome	76
Figure 21. Signalisations induite suite à un choc thermique	82
Figure 22. Exemples d'induction d'une hyperthermie locale	88

Résultat

Figure 23. Un choc thermique sensibilise les cellules cancéreuses à l'apoptose induite par TRAIL	94
Figure 24. L'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique est dépendante de la caspase-8 et associée à l'augmentation de l'activation des caspases	96
Figure 25. L'efficacité de la combinaison de TRAIL et d'un choc thermique est dépendante de la température et de la synchronisation des traitements	98
Figure 26. Un choc thermique sensibilise à TRAIL par un mécanisme indépendant de l'activation de la voie mitochondriale	100
Figure 27. Un choc thermique retarde la formation du DISC et inhibe le recrutement de FLIP en son sein	102
Figure 28. Les protéines constitutives du DISC de TRAIL ne sont pas présentes dans les radeaux lipidiques	106
Figure 29. La quantité de FLIP est corrélée à la réponse des cellules cancéreuses à l'hyperthermie	108
Figure 30. La sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie est dépendante de FLIP	110
Figure 31. FLIP devient insoluble au cours d'un choc thermique	112
Figure 32. Le glycérol inhibe l'agrégation de FLIP et restaure sa fonction au cours d'un choc thermique	114
Figure 33. La sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie est dépendante de FLIP	116

Figure 34. La précipitation de FLIP ne dépend pas d'une modification post-traductionnelle connue	118
Figure 35. La précipitation de FLIP n'est pas dépendante de la boucle FL en position 114 ni de la dégradation protéasomale ou de la synthèse <i>de novo</i>	120
Figure 36. L'insolubilisation de FLIP est associée à celle d'HSP27 et d'ubiquitine	124
Figure 37. HSP27, HSP70 et HSP90 impactent différemment la synergie entre TRAIL et l'hyperthermie.	126
Figure 38. HSP27 n'affecte pas l'insolubilisation de FLIP	130
Figure 39. RIP1 n'est pas impliqué dans la sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie	132
Figure 40. La sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie dépend principalement de TRAIL-R2	134
Figure 41. La caspase-8 est différenciellement activée sur TRAIL-R1 ou sur TRAIL-R2	138

Discussion

Figure supplémentaire 1. L'hyperthermie, un catalyseur de l'apoptose pour les thérapies anticancéreuses	142
Figure supplémentaire 2. TRAIL-R1 vs TRAIL-R2 - des mécanismes différents qui impliquent FLIP et la caspase-8	144
Figure supplémentaire 3. Quel rôle pour la mitochondrie?	146
Figure supplémentaire 4. La dégradation de FLIP au cours d'un choc thermique	150
Figure supplémentaire 5. HSP27 le bilan	152
Figure supplémentaire 6. Le rôle de FADD dans l'apoptose induite par TRAIL et par l'hyperthermie	154
Figure supplémentaire 7. La présence d'un complexe FADD/C8/FLIP/RIP1 à l'état basal	156

Liste des tableaux

Tableau 1. Membres de la superfamille du TNF	26
Tableau 2. Formes recombinantes de TRAIL	52
Tableau 3. Ratio de sensibilisation par la température de différents agents chimiothérapeutiques	86

Avant propos

Ce travail a été réalisé dans le cadre de la lutte contre le cancer et a été rendu possible grâce au soutien financier du ministère de la recherche français et de la ligue contre le cancer.

Ce projet s'est porté sur l'étude et la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le déclenchement de la mort cellulaire programmée. La mort cellulaire est un processus biologique utilisé et étudié par la communauté scientifique et médicale dans le domaine de la cancérologie. Une meilleure connaissance des mécanismes contrôlant la mort des cellules, et particulièrement la mort des cellules cancéreuses, permettrait d'envisager de nouveaux traitements ou de rendre les traitements existants plus efficaces et/ou mieux tolérés par les malades.

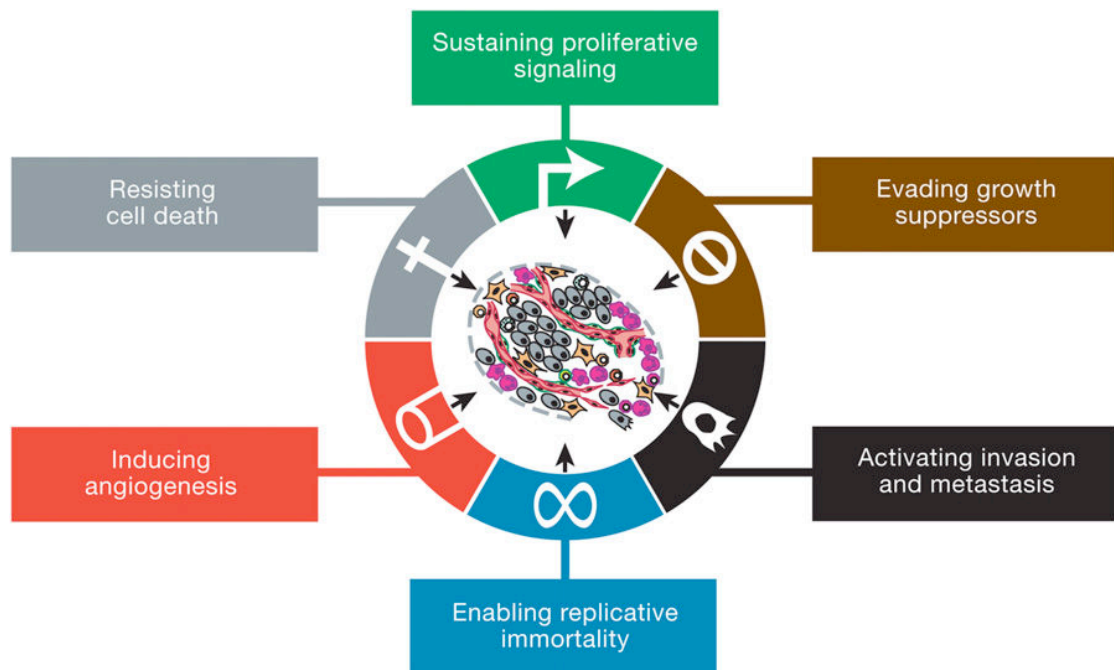


Figure 1. Les caractéristiques essentielles des cancers

Illustration des 6 capacités acquises par les cellules cancéreuses au cours de la cancérogenèse : maintien de la prolifération, insensibilité aux mécanismes anti-prolifératifs, invasion et production de métastases, prolifération illimitée (immortalité), stimulation de l'angiogenèse et résistance aux phénomènes de mort cellulaire. (d'après Hanahan et Weinberg, 2011)

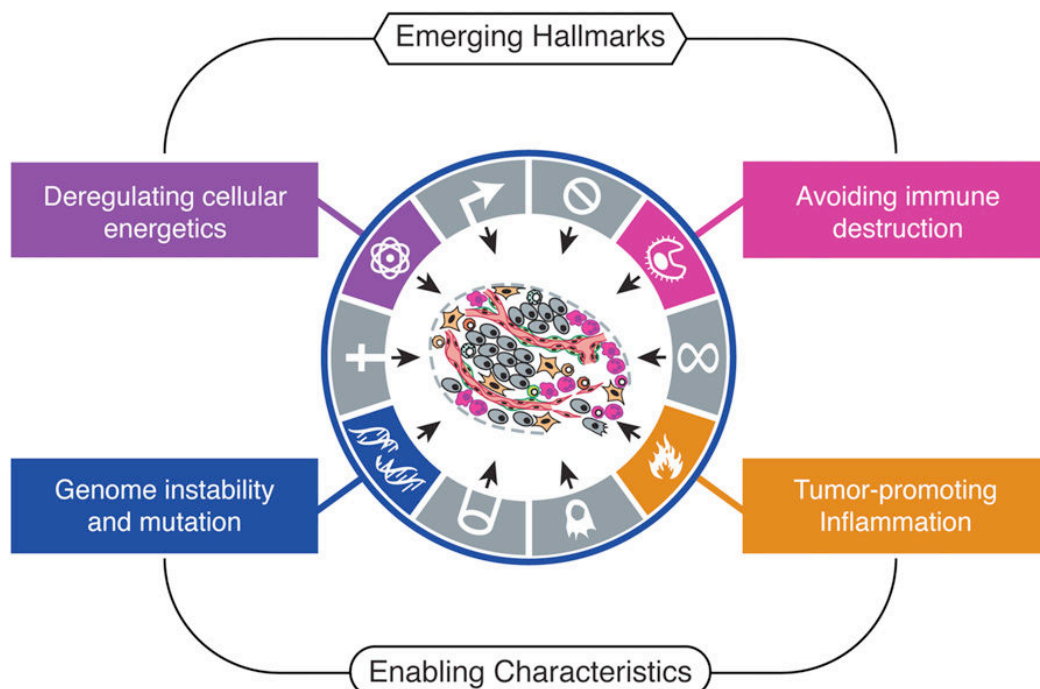


Figure 2. Les caractéristiques supplémentaires des cancers

L'instabilité génomique et en moindre mesure l'inflammation des tissus sont deux caractéristiques qui favorisent l'acquisition des autres capacités. La modification du métabolisme énergétique et la capacité à éviter ou à résister aux attaques du système immunitaire sont également proposées comme capacités inhérentes aux cellules cancéreuses. (d'après Hanahan et Weinberg, 2011)

Le cancer est une cause majeure de décès précoces dans le monde. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, les différentes formes de cancer ont été responsables de la mort de 8,2 millions d'individus en 2012. Son incidence est en constante augmentation (+8% par rapport à 2008) et selon les spécialistes, celle-ci va se poursuivre et s'amplifier au cours des années à venir (Bray *et al.*, 2012). Cette augmentation peut être expliquée en grande partie par l'accroissement de la population et par son vieillissement mais également par les récents progrès en matière de dépistage et de diagnostic. Enfin, une part non négligeable mais variable selon le pays en question, peut être imputée à certains facteurs environnementaux favorisant l'apparition de cancers. Si les paramètres de l'accroissement de la population et du vieillissement sont pris en compte, l'incidence des cancers en France a tendance à se stabiliser, principalement en raison d'une baisse de l'incidence des cancers du sein et de la prostate. La lutte contre le cancer est ainsi devenue au cours des dernières décennies une priorité de santé publique.

I. Le cancer et la cancérogenèse

Le cancer, ou tumeur maligne, est un terme général qui regroupe un grand nombre de maladies pouvant toucher toutes les parties du corps. Les cancers sont définis par la présence dans l'organisme de cellules anormales qui ont acquis, suite à des modifications génétiques, des capacités exceptionnelles de prolifération, d'invasion ou de résistance au stress et à la mort. Les caractéristiques de chaque cancer tiennent entre autres du tissu d'origine et des modifications génétiques subies, ce qui rend chaque maladie unique.

Les caractéristiques des cellules cancéreuses

Plusieurs modèles ont été établis dans le but d'organiser et de rendre plus compréhensible la complexité des étapes du développement d'un cancer et l'acquisition de ses différentes caractéristiques. Parmi ces modèles, celui de Hanahan et Weinberg se découpe en six capacités distinctes (figure 1). Les auteurs estiment que la grande majorité des cancers, sinon tous, acquièrent successivement les caractéristiques développées ci-dessous (Hanahan et Weinberg, 2011 ; Hanahan et Weinberg, 2000) :

- le maintien de la prolifération (facteurs de croissance)
- une insensibilité aux signaux et mécanismes anti-prolifératifs

- la disparition et/ou la résistance aux phénomènes de mort cellulaire
- une capacité proliférative non limitée par les mécanismes de vieillissement (croissance à l'infini)
- une capacité anormale à susciter l'angiogenèse
- l'acquisition d'un pouvoir invasif et de production de métastases

Ces six capacités, considérées comme essentielles, peuvent être acquises par différents mécanismes à la suite de mutations génétiques. Quatre capacités nouvelles peuvent être ajoutées (figure 2). L'instabilité génomique et dans une moindre mesure l'inflammation des tissus, sont deux caractéristiques des cellules cancéreuses qui favorisent l'acquisition des autres capacités (Colotta *et al.*, 2009; Negrini *et al.*, 2010). Également, une reprogrammation du métabolisme énergétique lui permettant de supporter la prolifération soutenue et une capacité à éviter ou à résister aux attaques du système immunitaire ont été proposées comme caractéristiques inhérentes aux cellules cancéreuses (Kim *et al.*, 2007; Cantor et Sabatini, 2012).

Les étapes du développement d'un cancer – la cancérogenèse

Chaque cancer est issu de la transformation d'une ou plusieurs cellules normales en cellules dites cancéreuses. Cette transformation est provoquée par des mutations génétiques qui peuvent avoir différentes origines comme des radiations, un environnement chimique mutagène ou une infection virale. Plusieurs modèles de cancérogenèse ont été développés pour décrire les différentes étapes du développement d'un cancer suivant l'origine des cellules cancéreuses et la source des mutations (Vineis *et al.*, 2010). Les différents modèles contiennent généralement trois étapes distinctes à savoir l'initiation, la promotion et la progression (Moolgavkar et Knudson, 1981).

Etape 1, l'initiation.

C'est une étape d'accumulation d'anomalies génétiques suite à des mutations spontanées ou à l'exposition à un composé carcinogène. Par l'activation d'oncogènes et l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur cette étape mène à :

- l'immortalisation de la future cellule cancéreuse, celle-ci devient incapable d'initier sa mort.

- La perte de l'homéostasie, à savoir la perte de l'équilibre entre la division et la mort des cellules nécessaire au maintien de la taille et de la fonctionnalité d'un organe.

Etape 2, la promotion.

Cette étape est caractérisée par la présence de facteurs prolifératifs, ainsi que par une grande instabilité génomique. Cette instabilité est due à la mutation des gènes "portiers" régulant le cycle cellulaire ainsi que des gènes soignants qui assurent la réparation des anomalies génétiques. A ce stade, la tumeur est infra-clinique, les cellules pré-cancéreuses se développent peu à cause d'un manque de nutriments et d'oxygène.

Etape 3, la progression

Par la suite, une étape d'angiogenèse via la sécrétion de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales permet aux cellules cancéreuses de subvenir à leurs besoins en nutriments et oxygène. La circulation sanguine stable mise en place par l'angiogenèse, permet le caractère invasif de la tumeur et une dissémination probable de métastases.

L'évolution d'un cancer dépend de son origine tissulaire et de sa prise en charge. Au niveau local, la tumeur provoque à terme une compression des organes voisins, voir un envahissement et une destruction des tissus adjacents. À l'échelle du corps, il peut se développer au point de provoquer l'épuisement et la mort de l'organisme.

II. Les causes et les facteurs à risques.

Le développement d'un cancer est très étroitement lié à la stabilité génétique des cellules d'un organisme. L'accumulation de mutations détermine la vitesse de progression du processus de cancérogenèse. Chaque cellule d'un organisme subit au cours de sa vie un certain nombre de mutations qui dans l'écrasante majorité des cas seront sans conséquence. Également, la plupart des lésions pré-cancéreuses qui se développent dans la vie d'une personne sont détruits par son système immunitaire.

Le nombre d'événements et l'accumulation des mutations avec le vieillissement mènent statistiquement à l'aboutissement du processus de cancérogenèse chez un certain nombre de personnes au sein d'une population. Bien qu'une proportion des cancers se développe de manière aléatoire, leur apparition peut être dans certains cas et en partie due à une composante héréditaire. Par exemple, la présence de mutations dans les gènes suppresseurs de tumeur *BRCA1* ou *BRCA2* est fortement associée au développement du cancer du sein ou des ovaires (Fackenthal et Olopade, 2007). Également, un certain nombre de risques dits "environnementaux" favorisent leur apparition et leur développement :

- l'alcool et le tabac sont deux facteurs à risques majeurs pour différents cancers digestifs et respiratoires (Boffetta *et al.*, 2006 ; Tsugane, 2013)
- les rayonnements ionisants dont les UV sont cancérogènes (Narayanan et Saladi, 2010). Par ailleurs, certaines études récentes mettent en corrélation l'utilisation régulière d'un téléphone portable avec l'incidence des cancers du cerveau sans qu'un lien de cause à effet ait été réellement démontré et soit unanimement reconnu (Szmigielski, 2013).
- Les micro-organismes, notamment les virus peuvent provoquer certains cancers comme le cancer du col de l'utérus (Read et Douglas, 2014 ; Chen *et al.*, 2014)
- L'obésité est reconnue comme un facteur à risque, particulièrement dans le cas des cancers dits "hormono-dépendants" (Kaaks *et al.*, 2002)
- Les polluants et les perturbateurs endocriniens tels que l'amiante, le benzène, le formaldéhyde ou encore le bisphénol-A sont des cancérogènes reconnus. L'exposition à certains pesticides est également soupçonnée d'être une cause de cancer chez les agriculteurs et les consommateurs (George et Shukla, 2011). Cependant, leur rôle et leur incidence restent difficiles à évaluer du fait de leur très large utilisation.

Pour illustrer ces propos par un exemple, le virus du papillome humain (*human papillomavirus* - HPV) est à l'origine de plus de 80 % des cas de cancer du col de l'utérus (Parkin et Bray, 2006). Suite à une infection, le corps élimine le virus dans la majorité des cas et les conséquences restent bénignes. Cependant, une infection persistante est observée chez environ 15% des personnes atteintes (Liaw *et al.*, 2001), ce qui permet à certaines cellules infectées d'échapper au système immunitaire grâce à la présence de l'ADN viral. Les cellules déstabilisées génétiquement et non-éliminées par l'organisme vont pouvoir accumuler des mutations supplémentaires et poursuivre un processus de

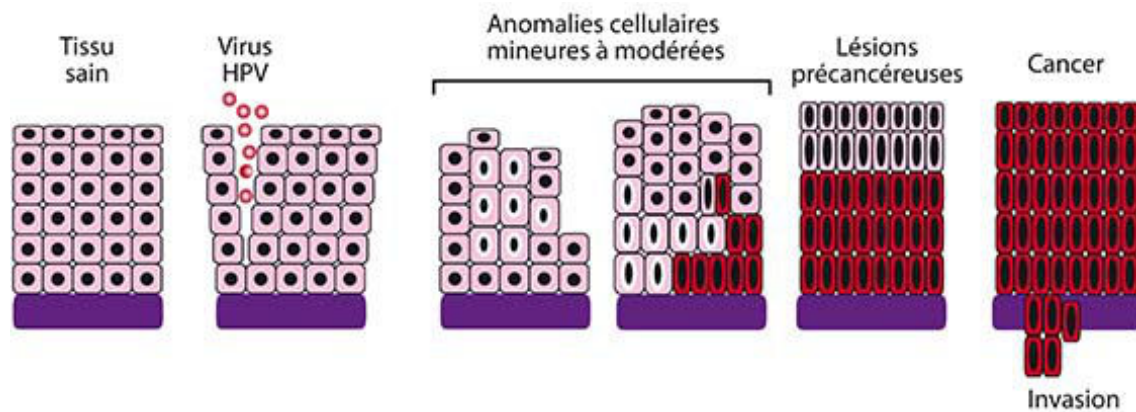


Figure 3. Les stades de développement d'un cancer de l'utérus

Suite à l'infection par un virus HPV (*human papilloma virus*), les cellules sont modifiées et présentent des anomalies mineures à modérées. Si les cellules ne sont pas détruites par le système immunitaire, elles peuvent provoquer des lésions pré-cancéreuses et évoluer jusqu'au stade de cancer.

cancérogenèse (figure 3) (Stanley *et al.*, 2007). Les capacités immunitaires de l'hôte sont déterminantes pour le caractère persistant ou transitoire de l'infection (Frazer *et al.*, 2009). Dans ce cadre là, le fait de fumer est un facteur à risque car la cigarette diminue la réponse immunitaire et favorise la persistance d'une infection par HPV (Sopori, 2002; Xi *et al.*, 2009).

La prévention

La prévention contre le cancer consiste en grande partie à éviter ou à se protéger des risques environnementaux connus.

Certaines molécules, présentes dans l'alimentation ont montré des propriétés susceptibles de diminuer le risque de développer certains cancers. On retrouve entre autres des fibres, des vitamines et des anti-oxydants, présents notamment dans les fruits et les légumes, le thé et l'ail (Faivre et Giacosa, 1998; Forester et Lambert, 2010 ; Krishnan *et al.*, 2010). En résumé, une hygiène de vie, par une alimentation équilibrée et une activité physique régulière sont des facteurs déterminants dans la prévention des cancers (Na et Oliynyk, 2011).

Enfin la prévention passe par le dépistage précoce des cancers, avec l'objectif de les diagnostiquer avant l'apparition des premiers symptômes. Ce paramètre fait l'objet d'intenses recherches notamment dans le développement de marqueurs du cancers présent dans le sang, les urines voir dans l'air expiré (Hundt *et al.*, 2007).

III. Les traitements existants

Une fois un cancer diagnostiqué, la médecine dispose de différentes possibilités pour soigner les patients atteints d'un cancer. Chaque cas étant unique, une stratégie thérapeutique est définie par l'équipe médicale en fonction du type de cancer, de son extension, de la présence ou non de métastases et de l'état de santé du patient. La thérapie doit également être envisagée en fonction du gain espéré, de ses chances de réussite mais également en fonction des effets secondaires subis par l'organisme à long et court termes. C'est une combinaison de traitements qui est généralement proposée aux patients et la thérapie peut, suivant les cas, consister en :

- l'ablation chirurgicale de la tumeur. C'est le moyen curatif le plus efficace, le plus sûr et le plus utilisé pour traiter un cancer. Ce traitement est néanmoins limité par l'accessibilité et il n'est applicable qu'aux tumeurs solides.
- Un traitement percutané par radiofréquence, cryothérapie ou micro-ondes. Ces traitements peuvent être proposés localement en complément ou en alternative à la chirurgie.
- La radiothérapie. C'est l'irradiation de la tumeur par des rayonnements ionisants dans le but de déclencher la mort des cellules cancéreuses. Elle peut être utilisée seule ou en complément de la chirurgie ou de la chimiothérapie.
- La chimiothérapie. C'est l'utilisation de molécules chimiques toxiques pour les cellules cancéreuses dans le but d'arrêter leur prolifération et/ou de déclencher leur mort.

Certains types de cancers peuvent être traités par des techniques plus spécifiques. Parmi elles, on retrouve par exemple des traitements hormonaux, applicables aux cancers du sein, des ovaires, de la prostate et des testicules ou des traitements par photochimiothérapie applicables aux cancers de la peau.

Les thérapies alternatives

L'espérance de vie d'un patient varie considérablement selon le type de cancer et son stade de développement. Certains ont un très mauvais pronostic vital et la médecine contemporaine n'a parfois pas de thérapie efficace à proposer. L'impuissance de la médecine et/ou le manque de confiance envers le système de santé favorisent, en parallèle de la médecine allopathique, le développement de thérapies dites "alternatives".

Par définition, celles-ci ne sont pas proposées dans les hôpitaux et ne sont pas basées sur des preuves scientifiques tangibles et/ou validées par des modèles expérimentaux. Les thérapies alternatives, également appelées thérapies “non-prouvées”, ne doivent pas être confondues avec les nouvelles thérapies en phase d’essai clinique.

Facilement relayés sur internet, de nombreux régimes, substances ou traitements sont décrits et/ou vendus sur une base plus ou moins scientifique. La majorité de ces thérapies ont fait l’objet d’études scientifiques sérieuses dans la deuxième moitié du 20^{ème} siècle et ont été abandonnées pour leur manque d’efficacité (Ernst et Cassileth, 1999). Autrement dit, pour beaucoup de ces thérapies, l’efficacité n’est pas seulement non prouvée, elle a été réfutée. C’est le cas par exemple des traitements à base de vitamine C, de laetrile ou de cartilage de requin (Milazzo *et al.*, 2011). C’est également le cas de la méthode de *Livingston-Wheeler*, de la multithérapie *Di Bella* ou du traitement de *Revici* qui peuvent encore être proposés dans certaines cliniques (Ernst et Cassileth, 1999).

Certains problèmes peuvent être posés par ces thérapies, le premier étant l’incertitude. Il existe toujours un risque d’une potentielle nocivité, voir d’une toxicité pour le patient, surtout si ces thérapies sont mal encadrées. De plus, dans la mesure où ces méthodes ne font généralement pas ou plus l’objet d’études scientifiques, il est généralement difficile de prévoir leurs effets indésirables, les contre-indications ou leur compatibilité avec d’autres thérapies. Deuxièmement, certains patients essaient une thérapie alternative avant une thérapie classique, retardant ainsi leur prise en charge médicale et réduisant ses chances de réussite. Enfin le problème peut être d’ordre éthique dans le cas où les thérapies proposées le sont uniquement dans un but lucratif et profitent de la crédulité et du désespoir de certains malades.

Les thérapies complémentaires

Récemment, des thérapies dites “complémentaires” (*complementary therapies - CAM*) aux traitements conventionnels - tels que le sport, l’acupuncture, le yoga ou encore des régimes allant jusqu’au jeûne thérapeutique - sont de plus en plus plébiscités par les malades du cancer (Horneber *et al.*, 2012; Wilkinson et Stevens, 2014). Nombre de ces thérapies n’ont pas pour vocation d’agir sur l’évolution de la maladie mais de réduire les effets secondaires des traitements et de permettre aux malades de mieux gérer les stress émotionnels et mentaux (Klafke *et al.*, 2014; Henneghan et Harrison, 2014; Sawyer,

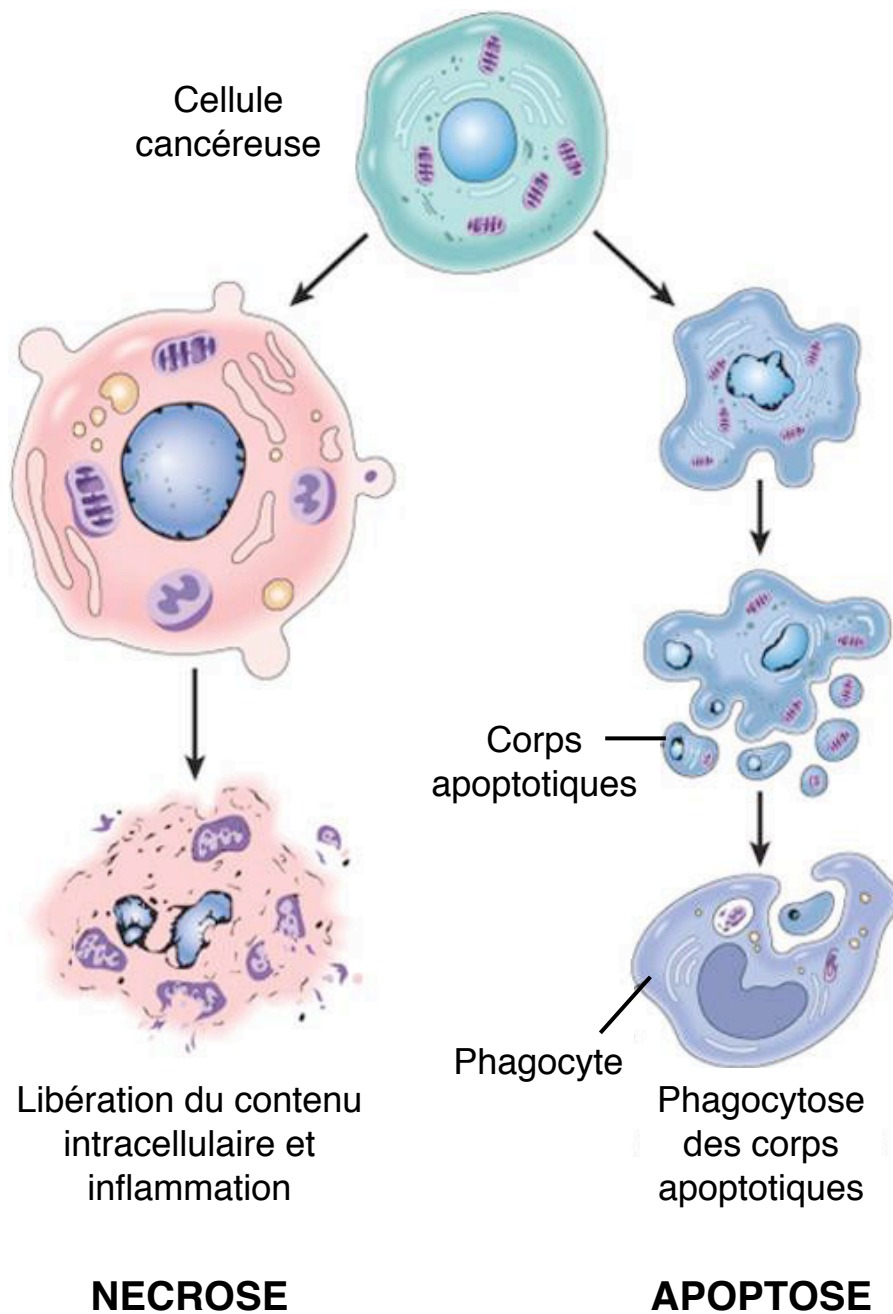


Figure 4. La mort cellulaire - apoptose VS nécrose

La nécrose conduit à la mort de la cellule avec la perte de l'intégrité de la membrane, une libération du contenu intracellulaire ce qui provoque l'inflammation des tissus environnants. L'apoptose consiste en la dislocation de la cellule sans la perte de l'intégrité de la membrane. Cette mort ne provoque pas d'inflammation et favorise la phagocytose des débris cellulaires.

2014). Au même titre que les thérapies alternatives, celles-ci ne sont pas proposées dans les hôpitaux et ne reposent pas sur des preuves scientifiques clairement établies. Cependant, les études démontrant l'intérêt de certaines de ces activités s'accumulent. Par exemple, les activités sportives présentent un grand intérêt pour l'amélioration de la qualité de vie des malades (Sawyer, 2014; Eyigor et Kanyilmaz, 2014; Taso *et al.*, 2014). Autre exemple, alors que les recommandations médicales actuelles incitent à une forte prise calorique avant un traitement chimiothérapeutique, un jeûne de 48h présenterait l'intérêt de diminuer l'intensité des effets secondaires qui lui sont associés (Raffaghello *et al.*, 2010; Lee et Longo, 2011). Ces avancées récentes ont notamment mené l'institut Curie au développement d'un programme axé sur la diététique et l'activité physique des personnes atteintes par le cancer (programme activ' de l'institut Curie).

Par ailleurs, l'importance de la dimension psychologique et de l'implication du patient dans sa guérison font désormais consensus dans le corps médical (Entwistle *et al.*, 2010). Dans cette optique, les thérapies complémentaires voir alternatives, si elles n'interfèrent pas avec les traitements conventionnels, peuvent présenter de nombreux intérêts.

IV. La mort cellulaire programmée

Les traitements radio- et chimiothérapeutiques, à la différence de la chirurgie ou de la cryothérapie, détruisent les tumeurs par des effets toxiques. Ces traitements déclenchent la mort des cellules cancéreuses par des mécanismes moléculaires internes. On parle de mort cellulaire programmée car les mécanismes impliqués sont le fruit de l'évolution des êtres vivants pluricellulaires et permettent, par le sacrifice d'une ou plusieurs cellules, la survie ou le développement de l'organisme. L'apoptose, est un mécanisme majeur de la mort cellulaire programmée. C'est un système d'auto-destruction présent dans chaque cellule permettant d'éliminer des cellules devenues indésirables sans perturber l'homéostasie de l'organisme. Contrairement à la nécrose, l'apoptose ne provoque pas ou peu d'inflammation et favorise la phagocytose des débris cellulaires (figure 4). Les cellules cancéreuses se sont développées en rendant ce système défaillant, les protégeant ainsi d'une mort spontanée. Par exemple, la radiothérapie ainsi que certains agents chimiothérapeutiques, ont pour effet le déclenchement de l'apoptose en bloquant la prolifération à la suite de dommages à l'ADN.

La diversité génétique entre les cellules cancéreuses et les contraintes biologiques qu'elles subissent mènent invariablement au développement de populations cancéreuses résistantes aux traitements pro-apoptotiques. L'un des objectifs de la recherche sur le cancer, dans lequel s'intègre mon projet, est de comprendre ces mécanismes de résistance afin de les contourner.

Introduction bibliographique

Cette partie bibliographique a pour objectif de synthétiser les connaissances théoriques en relation avec ce projet.

Le premier chapitre est axé autour de la voie apoptotique de TRAIL. Il décrit les différentes étapes du processus apoptotique, la fonction biologique de TRAIL dans l'organisme, les propriétés de TRAIL et de ses récepteurs, les mécanismes de sa voie de signalisation et enfin les avancées en cliniques de TRAIL et de ses dérivés.

Le deuxième chapitre est focalisé sur les principaux membres de la famille des protéines de choc thermique. Ce chapitre se concentre sur la structure et les fonctions anti-apoptotiques des membres HSP27, HSP70 et HSP90.

Enfin, le troisième chapitre est porté sur l'hyperthermie. Il décrit ses différents effets cellulaires ainsi que ses applications thérapeutiques et les moyens techniques permettant d'induire une hyperthermie.

Ligands		Récepteurs	
Nomenclature officielle	Nom usuel	Nomenclature officielle	Nom usuel
TNFSF1	LT α /TNF β	TNFRSF1A	TNFR1
		TNFRSF1B	TNFR2
		TNFRSF3	LT β R
		TNFRSF14	HveA
TNFSF2	TNF α	TNFRSF1A	TNFR1
		TNFRSF1B	TNFR2
TNFSF3	LT β	TNFRSF3	LT β R
TNFSF4	OX40L	TNFRSF4	OX40
TNFSF5	CD40L	TNFRSF5	CD40
TNFSF6	CD95L/FasL	TNFRSF6	CD95/Fas
		TNFRSF6B	DcR3
TNFSF7	CD27L	TNFRSF7	CD27
TNFSF8	CD30L	TNFRSF8	CD30
TNFSF9	4-1BBL	TNFRSF9	4-1BB
TNFSF10	TRAIL	TNFRSF10A	TRAIL-R1/DR4
		TNFRSF10B	TRAIL-R2/DR5
		TNFRSF10C	TRAIL-R3/DcR1
		TNFRSF10D	TRAIL-R4/DcR2
		TNFRSF11B	OPG
TNFSF11	RANKL	TNFRSF11A	RANK
		TNFRSF11B	OPG
TNFSF12	TWEAK	TNFRSF12A	FN14
TNFSF13	APRIL	TNFRSF13B	TAC1
		TNFRSF17	BCMA
TNFSF13B	BAFF	TNFRSF13B	TAC1
		TNFRSF17	BCMA
		TNFRSF13C	BAFFR
TNFSF14	LIGHT	TNFRSF3	LT β R
		TNFRSF6B	DcR3
		TNFRSF14	HveA
TNFSF15	VEGI/TL1A	TNFRSF25	DR3
		TNFRSF6B	DcR3
TNFSF18	GITRL	TNFRSF18	GITR

Tableau 1. Membres de la superfamille du TNF

Liste non exhaustive des récepteurs et des ligands de la famille du TNF (tumor necrosis factor).

I. TRAIL - Fonctions, mécanismes et applications

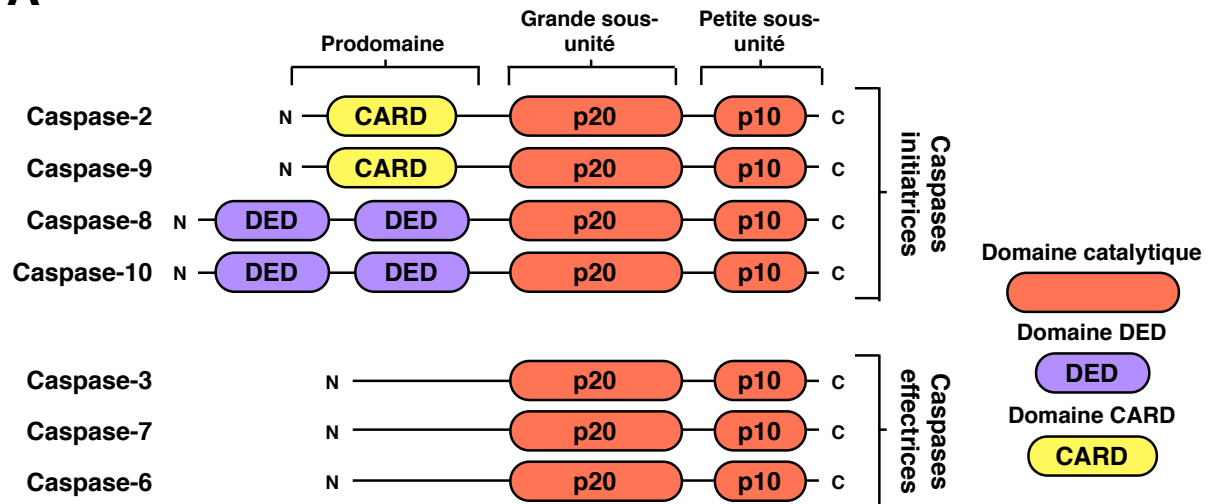
TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) fut identifié pour la première fois par Wilsey et son équipe en 1995 et décrit pour induire une mort apoptotique de diverses cellules cancéreuses (Wiley *et al.*, 1995). La découverte de TRAIL fait suite à celle du TNF α (*tumor necrosis factor alpha*) en 1975 par Carswell et son équipe (Carswell *et al.*, 1975). Le TNF α a suscité l'intérêt en cancérologie pour sa capacité à provoquer la nécrose de tumeurs sous-cutanées chez la souris mais s'est montré très toxique lors des essais cliniques (Lejeune *et al.*, 1998). Plusieurs protéines homologues, dont TRAIL, ont été par la suite découvertes et regroupées dans la super-famille du TNF qui est constituée d'au moins vingt ligands et 29 récepteurs (Tableau 1). Les récepteurs de cette famille sont caractérisés par la présence d'un domaine extracellulaire impliqué dans la reconnaissance du ligand et d'un domaine intracellulaire responsable de la transmission du signal. Ses membres sont impliqués dans des processus nombreux et variés tels que la prolifération, la différenciation, l'inflammation et la mort cellulaire (Li *et al.*, 2013).

Au même titre que la radiothérapie et certaines molécules chimiothérapeutiques, TRAIL est capable d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses tout en étant peu toxique pour les cellules saines. Les mécanismes impliqués sont bien décrits et ils ont l'avantage d'être différents et plus directs que les mécanismes impliqués dans la radiothérapie et la chimiothérapie.

1. L'exécution de l'apoptose

L'apoptose est un mécanisme majeur de la mort cellulaire au même titre que la nécrose ou la mort cellulaire par autophagie (figure 4 - page 22). Les cellules ayant reçu un signal apoptotique vont initier un processus de plusieurs étapes chronologiquement et spatialement organisées, aboutissant à leur mort et à leur élimination de l'organisme. Il existe une certaine hétérogénéité dans le déclenchement du processus qui peut être initié par différents stimuli et emprunter différentes voies de signalisation. Ainsi, on distingue la voie extrinsèque de la voie intrinsèque (Danial et Korsmeyer, 2004; Kroemer *et al.*, 2007). La voie extrinsèque est une voie directe passant par l'intermédiaire des récepteurs de mort et des membres de la famille du TNF, dont TRAIL et ses récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2. La voie intrinsèque quant à elle dépend de la mitochondrie et son activation

A



B

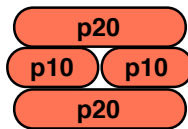


Figure 5. Structure des caspases

A. Illustration de la structure des pro-caspases et de leurs domaines enzymatiques constitués d'une petite (p10) et d'une grande (p20) sous-unité. Des domaines d'activation CARD (caspase activation and recruitment domain) ou DED (*death effector domain*) sont présents à l'extrémité N-terminale des caspases initiateuses.

B. Structure d'une caspase active formée de deux petites et de deux grosses sous-unités.

peut avoir pour origine différents stress aussi variés que la chaleur, les dommages à l'ADN ou encore l'hypoxie. Les différents stimuli menant à l'apoptose ont en commun *in fine* l'activation des caspases qui conduisent la cellule au cours des différentes étapes de son élimination.

A. Les caspases - les ouvrières de l'apoptose

Structure et activation

Le processus entier de l'apoptose repose sur l'activation et l'action des protéases à cystéine ou caspases (*cysteine-aspartic proteases*). Les caspases représentent une famille d'enzymes très conservée dont l'action est d'activer ou de désactiver leurs substrats par le clivage d'un motif protéique au niveau d'un acide aspartique (Degterev *et al.*, 2003). Leur site actif est composé d'une cystéine et d'une séquence impliquée dans la reconnaissance du motif substrat. Les caspases sont produites sous une forme inactive appelée pro-enzyme ou forme zymogène constituée de trois domaines distincts : un prodomaine NH₂-terminal impliqué dans son activation, une grande sous-unité et une petite sous-unité (figure 5A) (Dales *et al.*, 2001). Lors de l'activation des caspases, les grandes et petites sous-unités sont clivées et s'hétérodimérisent dans le cytosol pour former un hétérotétramère mature. Les formes actives des caspases sont ainsi constituées de deux grandes sous-unités (20 kDa) et de deux petites sous-unités (10 kDa) (figure 5B) (Walker *et al.*, 1994; Degterev *et al.*, 2003).

Classification et rôles biologiques

12 caspases ont été identifiées chez l'humain. Les caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 ont un rôle au cours du processus apoptotique. Parmi elles, deux groupes distincts peuvent être identifiés : les caspases initiatrices et les caspases effectrices.

- Les caspases initiatrices ou apicales (2, 8, 9 et 10) sont les premières caspases activées dans le processus. Cette activation a lieu au sein de complexes multi-protéiques à savoir : le PIDosome pour la caspase-2 (Tinel et Tschopp, 2004); l'apoptosome pour la caspase-9 (Zou *et al.*, 1999); le DISC pour les caspases 8 et 10 (Muzio *et al.*, 1996; Kischkel *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2003). Le prodomaine des caspases initiatrices est relativement long et contient un ou deux domaines d'interaction nécessaires à leur

activation. Il s'agit, soit d'un domaine CARD (*caspase activation and recruitment domain*) pour les caspases 2 et 9, soit d'un domaine DED (*death effector domain*) pour les caspases 8 et 10 (figure 5A). Une fois actives, elles ont pour cibles les caspases effectrices et pour rôle de les activer afin de poursuivre le processus apoptotique.

- Les caspases effectrices (3, 6, 7) sont en aval de la cascade d'activation des caspases et ne peuvent pas s'auto-activer (Nunez *et al.*, 1998). Le prodomaine des caspases effectrices est relativement court car le clivage par les caspases initiateuses est direct et ne nécessite pas la formation d'un complexe. Les caspases effectrices sont considérées comme les médiateurs de la mort cellulaire et conduisent un processus apoptotique général et indifférencié par l'origine de la stimulation (Stennicke *et al.*, 1998; Budihardjo, *et al.*, 1999). La caspase-3 est considérée comme la caspase effectrice principale qui clive la majorité des substrats cellulaires (Nicholson *et al.*, 1995; Porter et Janicke, 1999). La fonction de la caspase-7 est majoritairement redondante avec celle de la caspase-3 (Degterev *et al.*, 2003), à l'exception de certaines cibles spécifiques notamment impliquées dans l'apoptose induite par un stress du réticulum endoplasmique (Rao *et al.*, 2001).

- Les caspases 1, 4, 5, 11 et 12 ont été identifiées pour leur rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire. Une fois activées, elles forment des complexes appelés "inflammasomes" via leur domaine de recrutement CARD et déclenchent la sécrétion d'interleukines pro-inflammatoires (Martinon et Tschopp, 2007; McIlwain et Berger, 2013).

Les cibles des caspases effectrices

Une fois activées, les caspases effectrices sont capables de s'auto-amplifier par des mécanismes de rétroactivation sur les caspases initiateuses (Kominami *et al.*, 2012). Leurs cibles sont diverses, les plus importantes sont : les protéines du cytosquelette de type actine et myosine (Kothakota *et al.*, 1997; Moretti *et al.*, 2002; Nakazono *et al.*, 2002), des protéines d'adhésion de type cadhérines (Dusek *et al.*, 2006; Cirillo *et al.*, 2008), les flippases membranaires (Mandal *et al.*, 2002) ainsi que la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) et ICAD, l'inhibiteur des DNases nucléaires (Enari *et al.*, 1998; Boulares *et al.*, 1999).

B. Le processus apoptotique

L'apoptose a été décrite sur des critères morphologiques sans que les mécanismes biologiques impliqués soient précisés (Kerr *et al.*, 1972). Le clivage des cibles des caspases effectrices est responsable de l'apparition séquentielle des caractéristiques morphologiques et physiologiques de l'apoptose (van Engeland *et al.*, 1997; Galluzzi *et al.*, 2007; Kroemer *et al.*, 2009), à savoir :

- l'apparition des phosphatidylsérines à la surface de la membrane suite au clivage des flippases
- la rétractation des pseudopodes et le détachement des cellules suite au clivage des constituants du cytosquelette et des protéines d'adhésion
- la réduction du volume cellulaire et nucléaire (pycnose) ainsi que la condensation de la chromatine et la fragmentation du noyau (Caryorrhexie) suite à l'activation des DNases et des endonucléases
- la formation de bleb (*Blebbing* ou *zeiosis*) à la surface de la membrane plasmique suite à la contraction des filaments cytosquelettiques et le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique jusqu'aux phases terminales du processus
- enfin le fractionnement de la cellule en corps apoptotiques

Le rôle de l'apoptose est d'éliminer une cellule sans perturber l'homéostasie environnante. En ce sens, le fractionnement de la cellule en corps apoptotiques est associé à la production de signaux moléculaires, tels que l'exposition de la phosphatidylsérine à la surface de la membrane, ce qui incite à leur phagocytose (Fadok *et al.*, 1992). La phagocytose peut être faite par des macrophages ou des cellules épithéliales environnantes qui reconnaissent les débris par l'intermédiaire de récepteurs scavenger (Platt *et al.*, 1998; Savill et Fadok, 2000).

2. La fonction biologique de TRAIL

La voie de TRAIL est très étudiée pour ses propriétés anti-cancéreuses découlant de sa capacité à induire l'apoptose. Cependant, d'autres fonctions impliquées dans des processus tels que l'inflammation, la régulation immunitaire ou la lutte contre les maladies infectieuses ont été décrites. Cette partie a pour but de résumer les différents rôles physiologiques de TRAIL dans l'organisme dans le but de mieux comprendre cette protéine et ses intérêts ou inconvénients dans un cadre thérapeutique.

A. Les cellules exprimant TRAIL et ses récepteurs

TRAIL est très exprimé par des cellules de l'immunité innée et adaptative (Falschlehner *et al.*, 2009) telles que les cellules NK (*Natural Killer*) et NKT (*Natural killer T*) (Takeda *et al.*, 2001), les lymphocytes T (Kayagaki *et al.*, 1999a), ou encore les monocytes et macrophages (Griffith *et al.*, 1999), les cellules dendritiques (DC) (Fanger *et al.*, 1999) et les neutrophiles. L'expression de TRAIL est très dépendante de l'état d'activation des cellules immunitaires et de la présence de certaines cytokines, comme cela a été montré pour les cellules NK et des lymphocytes T CD8+ (Mirandola *et al.*, 2004). Également, l'activation des monocytes et des macrophages par des Lipopolysaccharides bactériens (LPS) augmente leur production de TRAIL (Halaas *et al.*, 2000; Ehrlich *et al.*, 2003).

Les cytokines de type "interféron", connues pour leurs effets pro-inflammatoires, antiviraux et anti-tumoraux (Maher *et al.*, 2007), ont un rôle central dans l'activation des cellules immunitaires et dans la production de TRAIL. L'interféron- γ semble être particulièrement important et induit l'expression de TRAIL dans les cellules monocytaires, dendritiques et NK (Fanger *et al.*, 1999; Griffith *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 2001; Ehrlich *et al.*, 2003). L'interféron- α (IFN- α) provoque la libération de TRAIL soluble par les neutrophiles (Tecchio *et al.*, 2004). Également, le groupe d'interféron dit de type 1, comprenant l'IFN- α , est impliqué dans l'expression de TRAIL par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ activés (Kayagaki *et al.*, 1999b).

L'expression de TRAIL est relativement restreinte, néanmoins cette protéine peut être exprimée dans différents tissus et types cellulaires autres que les cellules immunitaires. Ses transcrits sont détectés dans divers tissus et particulièrement la rate, les poumons et la prostate (Wiley *et al.*, 1995; <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000121858/tissue>). Également, certaines études ont montré par des colorations immuno-histochimiques que TRAIL et ses récepteurs sont exprimés dans les épithéliums et les cellules musculaires lisses normales ou anormales du poumon ou du colon (Robertson *et al.*, 2002; Koornstra *et al.*, 2003).

B. Le rôle physiologique de TRAIL

TRAIL est une protéine très conservée chez les organismes vertébrés, ce qui prédit un rôle important pour le fonctionnement de l'organisme. Pour évaluer l'importance d'une

protéine à l'échelle d'un organisme, la stratégie la plus courante est de générer un animal déficient (*knock out* ou KO) pour le gène en question.

a) *TRAIL, une cytokine anti-cancéreuse*

Dès la découverte de TRAIL en 1995, ses propriétés anti-tumorales ont été mises en évidence *in vitro* sur la lignée cancéreuse lymphoïde Jurkat (Wiley *et al.*, 1995). De nombreuses études ont confirmé la capacité de TRAIL à induire l'apoptose de lignées cancéreuses humaines et démontré la faible toxicité de son administration exogène (Ashkenazi *et al.*, 1999; Walczak *et al.*, 1999; Wu, 2009).

Chez l'humain

La fonction anti-cancéreuse de TRAIL repose sur son expression par différentes cellules immunitaires. TRAIL est nécessaire à la cytotoxicité et à l'activité anti-tumorale des monocytes, des cellules dendritiques, des neutrophiles, des lymphocytes T ou des NK (Zamai *et al.*, 1998; Griffith *et al.*, 1999; Fanger *et al.*, 1999; Dorothee *et al.*, 2002; Tecchio *et al.*, 2004; Koga *et al.*, 2004).

Chez la souris

TRAIL ne possède qu'un récepteur agoniste (mTRAIL-R) et deux récepteurs antagonistes (mDcTRAILR-1, mDcTRAILR-2, mTNFRH3 et mOPG) (Schneider *et al.*, 2003). Les modèles de souris KO TRAIL^{-/-} sont viables et ne présentent pas de défauts hématologiques et reproductifs majeurs (Finnberg *et al.*, 2008). L'importance de TRAIL dans la lutte anti-cancéreuse a été notamment démontrée par l'observation d'une cancérogenèse plus importante dans ces modèles déficients par comparaison à leurs homologues sauvages (Takeda *et al.*, 2002; Cretney *et al.*, 2002; Zerafa *et al.*, 2005). Le rôle anti-tumoral de TRAIL a également été démontré par la greffe de tumeurs syngéniques de lymphomes B dans des souris déficientes pour TRAIL (Sedger *et al.*, 2002) ou par l'utilisation d'anticorps bloquant son action (Cretney *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2003). Ces études ont montré que les cellules cancéreuses (lymphoïdes B ou rénales) se développent particulièrement mieux dans le foie des souris lorsque l'action de TRAIL a été inhibée.

Ces observations sont néanmoins controversées par quelques observations qui relativisent l'importance du pouvoir anti-cancéreux de TRAIL dans les modèles murins. Une étude montre que l'inactivation de TRAIL chez la souris n'affecte pas le développement de tumeurs d'origine thymique et intestinale (Yue *et al.*, 2005). Une autre étude ne montre pas d'effet de la présence de TRAIL dans la cancérogenèse mammaire murine (Zerafa *et al.*, 2005). Par une autre approche, Grosse-Wilde et son équipe ont montré que la déficience de l'unique récepteur agoniste mTRAIL-R (*murin TRAIL receptor*) n'affecte pas la croissance de cellules de carcinome épidermoïde mais augmente la formation de métastases dans les ganglions lymphatiques (Grosse-Wilde *et al.*, 2008). Ces controverses pourraient notamment être expliquées par le type de tissu étudié et le protocole d'induction tumorale. En effet, TRAIL semble particulièrement efficace sur les métastases et son action semble être particulièrement efficace dans certains organes comme le foie (Cretney *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2003 ; Grosse-Wilde *et al.*, 2008a; Grosse-Wilde *et al.*, 2008b). La souris reste un modèle différent de l'homme sur lequel les observations faites ne se vérifient pas systématiquement chez l'humain. Les éléments apportés par ces études pré-cliniques sont très importants mais doivent être considérés avec précaution.

b) Un régulateur de l'immunité

En tant que cytokine du système immunitaire, TRAIL a des rôles physiologiques autres que dans la lutte anti-tumorale. Pour le maintien de l'homéostasie immunitaire, certaines populations leucocytaires s'inhibent entre elles par l'intermédiaire de TRAIL ou de FasL. Par exemple, les Natural Killer (NK) ont la capacité de d'induire la mort des cellules dendritiques (DC) réduisant la réponse immunitaire et l'efficacité d'une vaccination (Hayakawa *et al.*, 2004). Également, les lymphocytes T helper (Th) utilisent TRAIL, FasL et leur capacité à induire l'apoptose dans l'auto-régulation des sous populations Th1 et Th2 (Zhang *et al.*, 2003).

Par ailleurs, TRAIL a un rôle dans la modulation de l'inflammation et de l'apoptose des cellules immunitaires. La délétion du récepteur agoniste murin se traduit par une augmentation de la réponse immunitaire innée et une meilleure capacité de l'organisme à répondre aux infections au cytomégalo virus (Diehl *et al.*, 2004). En cohérence avec cette dernière étude, les souris déficientes pour TRAIL montrent une résistance plus importante aux infections bactériennes du genre *Listeria* (Zheng *et al.*, 2004). Les souris déficientes

pour TRAIL montrent également un défaut d'inhibition des thymocytes et une sensibilité accrue à l'auto-immunité (Lamhamedi-Cherradi *et al.*, 2003). Enfin, TRAIL participe à la régulation des polynucléaires éosinophiles et au contrôle des processus inflammatoires chroniques dans le cas de l'asthme ou d'allergies (Robertson *et al.*, 2002). L'ensemble de ces études indique que TRAIL, en déclenchant l'apoptose de certaines populations immunitaires, restreint une immunité excessive aux antigènes du soi et du non-soi.

Pour conclure sur cette partie, TRAIL et ses récepteurs sont exprimés différenciellement au sein de l'organisme et par divers types cellulaires. Ses rôles biologiques sont majoritairement mais pas exclusivement en rapport avec le système immunitaire et le déclenchement de l'apoptose.

3. TRAIL et ses récepteurs

TRAIL agit par l'intermédiaire de ses récepteurs, il en possède cinq chez l'homme et les primates (figure 6A). Il interagit à la membrane avec : TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 et TRAIL-R4. Les récepteurs TRAIL-R1/2 sont considérés comme agonistes car leur liaison à TRAIL induit l'apoptose. Ils sont également appelés récepteurs de mort. Les récepteurs TRAIL-R3/4 et l'ostéoprotégérine (OPG) sont considérés comme antagonistes car leur liaison au ligand n'induit pas de signal apoptotique. TRAIL-R3/4 sont également appelés récepteurs leurres (*Decoy Receptor*). Cette partie a pour objectif de détailler le rôle et la structure des récepteurs à TRAIL.

A. Structure de TRAIL

Le gène codant pour TRAIL est situé sur le chromosome 3 en position 3q26, il est composé de cinq exons. TRAIL est produit sous la forme d'une protéine transmembranaire de type 2, c'est à dire une protéine traversant une seule fois la membrane plasmique et dont l'extrémité C-terminale est positionnée à l'extérieur de la cellule. D'une taille de 32 kilodaltons (kDa), TRAIL possède un domaine commun à la famille du TNF portant la fonction cytokinique à l'extérieur de la cellule. Ce domaine peut être clivé par des protéases à cystéine permettant la libération d'une forme soluble et fonctionnelle d'environ 20 kDa (Mariani et Krammer, 1998). TRAIL présente une activité optimale sous sa forme homotrimérique dont la conformation et la stabilité dépendent de la présence d'un atome

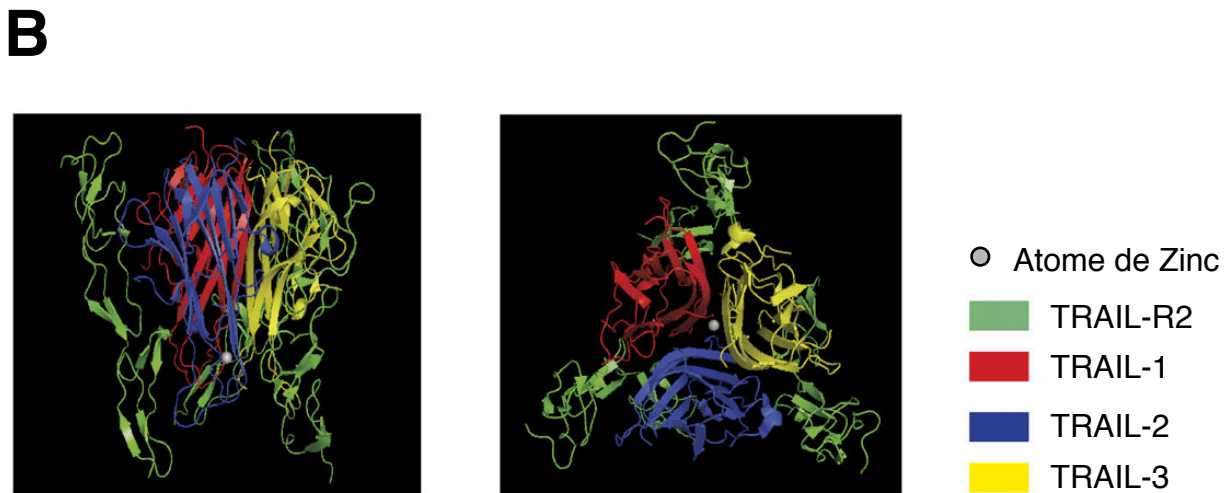
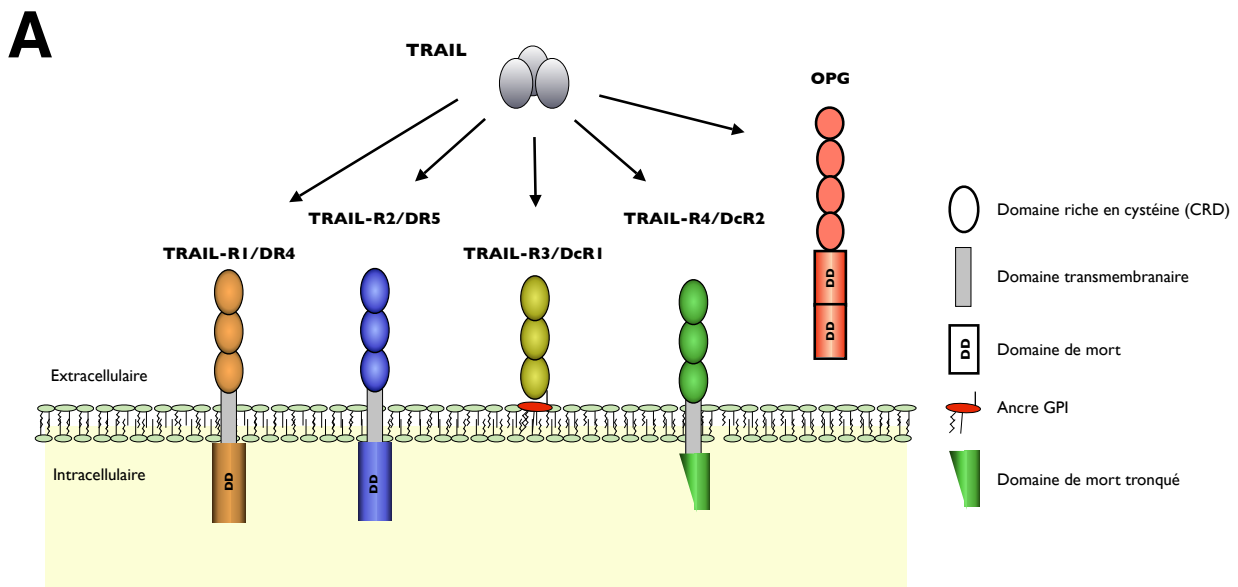


Figure 6. Structure de TRAIL et de ses récepteurs

A. Représentation schématique de TRAIL et ses récepteurs chez l'homme. TRAIL-R1 et TRAIL-R2 possèdent un domaine fonctionnel capable d'induire une signalisation apoptotique à la différence de TRAIL-R3, de TRAIL-R4 et de l'OPG.

B. Structure tridimensionnelle de TRAIL en fixation sur son ligand TRAIL-R2. L'atome de zinc est essentiel au maintien de la structure. (Adapté de Manzo *et al.*, 2009)

de zinc (figure 6B), ce qui le différencie des autres membres de la famille du TNF (Hymowitz *et al.*, 2000; Bodmer *et al.*, 2000a).

D'un point de vue biologique, TRAIL est le seul membre de sa famille à présenter une grande spécificité aux cellules cancéreuses. TRAIL n'induit la mort de fibroblastes humains que lorsque ceux-ci sont immortalisés puis transformés par l'oncogène Ras (Nesterov *et al.*, 2004). Chez la souris comme chez l'humain, l'injection de TRAIL recombinant est bien tolérée (Wiezorek *et al.*, 2010; Kelley *et al.*, 2001). Pour expliquer cette sélectivité, il a été suggéré que les cellules non cancéreuses bénéficient d'une certaine protection par l'intermédiaire de protéines anti-apoptotiques telles que FLIP, XIAP, par l'activation de MAPKinasés (Nesterov *et al.*, 2004). En ce sens, le proto-oncogène c-Myc sensibilise différentes lignées cellulaires normales à l'apoptose induite par TRAIL par la répression de FLIP (Ricci *et al.*, 2004).

B. Les récepteurs agonistes

Structure et isoformes

TRAIL-R1 (DR4/ *Death Receptor 4*/ TNFSF10A) (Pan *et al.*, 1997) et TRAIL-R2 (DR5/ *Death Receptor 5*/ KILLER/ TNFSF10B) (Walczak *et al.*, 1997) possèdent une identité de 55% l'une par rapport à l'autre ainsi qu'une structure très similaire. Ce sont des protéines transmembranaires de type 1, c'est à dire une protéine traversant une seule fois la membrane plasmique et dont l'extrémité N-terminale (N-ter) est positionnée à l'extérieur de la cellule. Ces récepteurs possèdent deux ou trois domaines riches en cystéines (CRD) localisés sur la partie extracellulaire de la protéine. En effet, le CRD1 qui est également appelé PLAD (*pre-ligand assembly domain*), est parfois considéré comme un CRD partiel (Kimberley et Screaton, 2004). Il est placé à l'extrémité N-ter et est responsable de l'interaction entre les récepteurs indépendamment de la fixation du ligand (Chan *et al.*, 2000). Une étude dynamique *in vitro* portée sur TRAIL-R2 a montré que le récepteur forme rapidement un dimère puis s'associe à un troisième monomère de manière asymétrique pour former un trimère. La fixation de TRAIL induit un changement conformationnel du trimère en une configuration parfaitement symétrique (Wassenaar *et al.*, 2008). Cette interaction sans ligand peut se faire de manière homo- ou hétérotypique entre TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (Clancy *et al.*, 2005). Les domaines CRD2 et CRD3 sont responsables de la liaison des récepteurs au ligand. Ces deux récepteurs sont également caractérisés par la

présence d'un domaine de mort (*Death Domain / DD*) dans leur partie intracellulaire, composé de 6 hélices α pour 80 acides aminés. Ce domaine est crucial pour la formation du DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) et la transmission du signal apoptotique (Ashkenazi et Dixit, 1998).

Deux isoformes de TRAIL-R2 ont été identifiées : une isoforme courte (TRAIL-R2_S ou TRAIL-R2A) et une isoforme longue (TRAIL-R2_L ou TRAIL-R2B) (Arai *et al.*, 1998; Wang et Jeng, 2000). La présence de ces isoformes est expliquée par la rétention d'un intron lors de l'épissage alternatif. Il en résulte une différence de 23 acides aminés entre le domaine transmembranaire et le premier domaine riche en cystéine (CRD) mais aucune distinction fonctionnelle n'a été mise en évidence pour l'instant.

Les modifications post-traductionnelles

TRAIL-R1 et TRAIL-R2 possèdent une cystéine, à proximité du domaine transmembranaire, prédit comme un site de palmitoylation potentiel. Cette modification n'a été validée expérimentalement que pour TRAIL-R1, ce qui lui permet de migrer dans des microdomaines membranaires très organisés (radeaux lipidiques) et d'induire un signal apoptotique de meilleure qualité (Rossin *et al.*, 2009; Marconi *et al.*, 2013). Les récepteurs TRAIL-R1/2 peuvent être glycosylés, ce qui favorise la multimérisation des récepteurs TRAIL-R2 et la transmission du signal apoptotique (Wagner *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2007).

C. Les récepteurs antagonistes

TRAIL-R3 (DcR1/ *Decoy Receptor 1*/ TRID/ TNFSF10C) (Sheridan *et al.*, 1997; Degli-Esposti *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997) est une protéine membranaire liée à la membrane par un Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (ancre GPI) et ne peut transduire de signal apoptotique (Sheridan *et al.*, 1997). Il inhibe le signal apoptotique de TRAIL en séquestrant le ligand dans les radeaux lipidiques (Mérino *et al.*, 2006).

TRAIL-R4 (DcR2/ *Decoy Receptor 2*/ TRUNDD/ TNFSF10D) (Marsters *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1998) est similaire à TRAIL-R1/2 en terme de structure et possède 54% d'identité avec TRAIL-R2. Ce récepteur possède cependant un DD tronqué et non fonctionnel ce qui rend impossible le recrutement de la protéine FADD et la formation du DISC (Marsters *et*

al., 1997). En plus de sa fonction de récepteur leurre, il est capable de se lier à TRAIL-R2 et d'inhiber le signal apoptotique de celui-ci à l'intérieur du DISC (Clancy *et al.*, 2005; Mérimo *et al.*, 2006).

L'ostéoprotégérine (OPG) est le seul récepteur à TRAIL soluble identifié. L'OPG est sécrété principalement sous la forme de dimères issus de deux monomères reliés par un pont disulfure (Simonet *et al.*, 1997). Cette protéine possède quatre CRD capables de reconnaître également RANKL (*receptor activator of NF- κ B ligand*), un autre membre de la famille du TNF. L'OPG a été découvert pour son rôle protecteur vis à vis de l'ostéolyse, d'où son nom. Malgré sa faible affinité pour TRAIL ($OPG_{KD} = 400$ nM), comparée à celle de TRAIL-R2 ($TRAIL-R2_{KD} = 2$ nM) (Truneh *et al.*, 2000), l'OPG protège efficacement les cellules cancéreuses de l'apoptose induite par TRAIL à des concentrations d'OPG et de TRAIL similaires (Emery *et al.*, 1998; Neville-Webbe *et al.*, 2004).

Pour conclure sur cette partie, le nombre et la diversité structurale des récepteurs à TRAIL, peu courants par comparaison aux autres membres de la famille du TNF, laisse présager une diversité des rôles ainsi que des régulations complexes de la voie de signalisation.

4. La signalisation apoptotique induite par TRAIL

La fixation de TRAIL sur ses récepteurs agonistes induit une signalisation cellulaire qui peut conduire à l'apoptose de la cellule. Les mécanismes moléculaires sont bien décrits et très similaires aux mécanismes d'apoptose induits par son homologue FasL. Cette partie a pour but de détailler ces mécanismes et les différents acteurs de la transmission du signal apoptotique de TRAIL par la voie extrinsèque ainsi que les interactions possibles avec la voie intrinsèque.

A. Apoptose extrinsèque - La voie principale de TRAIL

La fixation de TRAIL à ses récepteurs agonistes induit la formation d'un complexe appelé DISC (*death-inducing signaling complex*) et l'activation rapide des caspases.

La formation du DISC

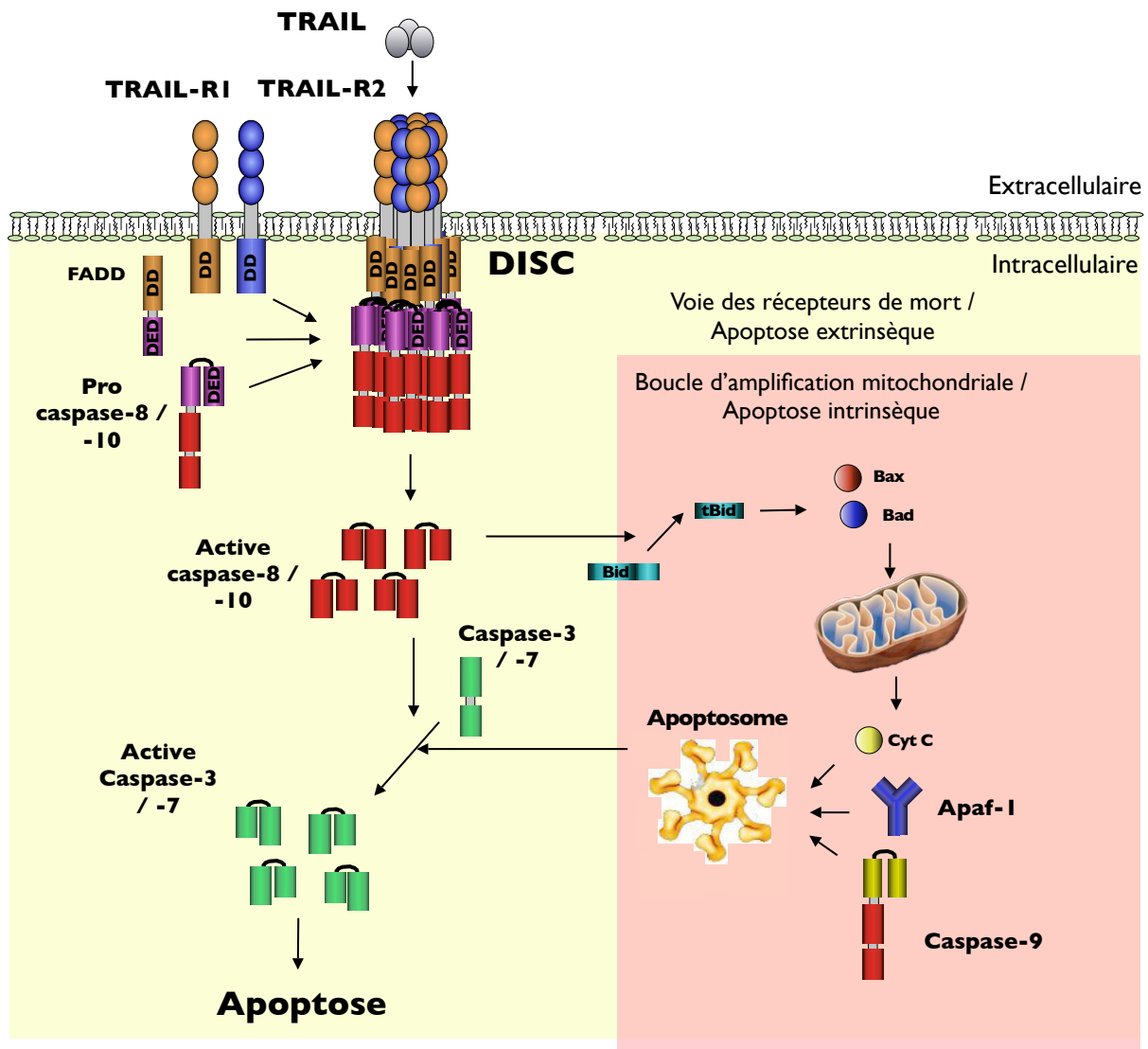


Figure 7. L'apoptose induite par TRAIL - voie extrinsèque et voie intrinsèque

- *Voie extrinsèque* : la fixation de TRAIL induit la multimérisation des récepteurs agonistes TRAIL-R1 et TRAIL-R2, le recrutement de FADD et des pro-caspases initiatrices -8 et -10 pour former le DISC. Les caspases 8 et 10 sont activées au sein du DISC et activent à leur tour les caspases effectrices 3 et 7 qui conduisent la suite du processus apoptotique.
- *Voie intrinsèque* : la caspase-8 activée clive Bid, son fragment t-Bid active Bax et Bak qui induisent l'activation de la mitochondrie et le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome-c est recruté par Apaf-1 et la procaspase-9 pour former l'apoptosome au sein duquel les procaspases 3 et 7 peuvent être activées.

La fixation de TRAIL à ses récepteurs agonistes induit leur changement de conformation et leur oligomérisation en un complexe de haut poids moléculaire (Hymowitz *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 2007). La protéine FADD est recrutée sur le DD de la partie intracellulaire des récepteurs TRAIL-R1/2 par des interactions homotypiques (figure 7) (Schneider *et al.*, 1997; Berglund *et al.*, 2000). FADD possède également un domaine effecteur de mort (*Death Effector Domain* ou DED) par lequel il interagit de manière homotypique avec les caspases initiatrices (Bodmer *et al.*, 2000b; Berglund *et al.*, 2000). Les caspases initiatrices 8 et 10, initialement présentes dans le cytoplasme sous la forme de zymogène, sont ainsi recrutées par l'intermédiaire de FADD aux récepteurs. Le recrutement des caspases 8 et 10 dans le DISC permet, par une proximité entre les sites catalytiques, leur activation par auto-protéolyse (Salvesen *et al.*, 1999; Sprick *et al.*, 2000 ; Kischkel *et al.*, 2000; Kischkel *et al.*, 2001). La stœchiométrie des différents composants du DISC n'est pas complètement établie. Cependant, une étude récente a proposé un modèle novateur où la quantité de FADD serait comparable à celle des récepteurs et où la quantité de caspase-8 leur serait jusqu'à neuf fois supérieure. Les caspases 8 formeraient une chaîne via leurs DED 1 et 2 qui serait nécessaire à leur activation (figure 8) (Dickens *et al.*, 2012). Ce modèle a également été proposé simultanément pour le DISC de Fas (Schleich *et al.*, 2012).

Le clivage des caspases initiatrices se fait premièrement au niveau d'un résidu d'acide aspartique (D374 pour la caspase-8b) et libère la petite sous-unité à l'extrémité C-terminale (p10). Le fragment restant (p43/p41) reste intégré au DISC pour subir le clivage de la grande sous-unité (p18/p20). Le clivage complet libère les caspases 8 et 10 du DISC, les grandes et les petites sous-unités sont relarguées dans le cytosol où elles forment les caspases 8 et 10 sous la forme d'un tétramère (p20₂p10₂). Ce clivage augmente l'activité catalytique des dimères et change sa spécificité aux substrats, ce qui leur permet entre autres de cliver les caspases effectrices et la protéine Bid (Boatright *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2009; Gonzalvez et Ashkenazi, 2010). L'activation des caspases effectrices est faite par le clivage de la région liant leur petite et leur grande sous-unité (Scaffidi *et al.*, 1998; Chai *et al.*, 2001a). Celles-ci conduiront la suite processus apoptotique.

Les caspases 8 et 10

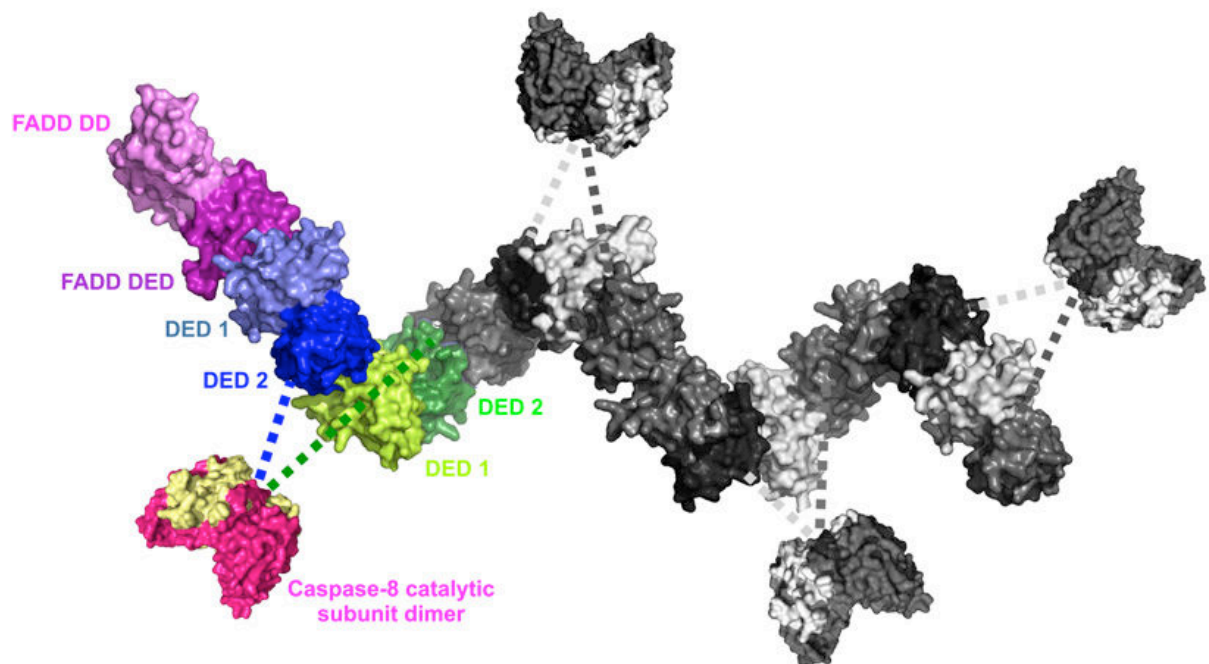


Figure 8. Modèle de structure de la caspase-8 dans le DISC

Le modèle de Dickens *et al.* propose des interactions au sein du DISC entre les DED1 et les DED2 de différentes caspases-8 menant à une chaîne de DED nécessaire à l'activation de celle-ci. (adapté de Dickens *et al.* 2012)

Plusieurs études ont montré que la signalisation apoptotique de TRAIL est très dépendante de la caspase-8 (Seol *et al.*, 2001; Eggert *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2009). De plus, une étude a montré que la transfection transitoire de la caspase-10 ne peut pas substituer au manque de la caspase-8 (Sprick *et al.*, 2002). *A contrario*, deux autres études ont montré que la caspase-10 peut restaurer la sensibilité à TRAIL de cellules déficientes en caspase-8 (Kischkel *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001).

B. Apoptose intrinsèque - La boucle d'amplification mitochondriale

Au cours de l'apoptose induite par TRAIL, la voie intrinsèque qui est aussi appelée la voie mitochondriale, est activée en parallèle de la voie extrinsèque et amplifie le signal apoptotique. La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie est l'étape clé de son activation. Celle-ci est régulée exclusivement par les protéines de la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*). Cette partie a pour objectif de détailler les mécanismes de la voie mitochondriale et son importance vis à vis de TRAIL.

La perméabilisation de la membrane mitochondriale

La voie mitochondriale est activée lors de l'apoptose induite par TRAIL par l'intermédiaire des caspases initiatrices 8 et 10 sous leur forme active et cytoplasmique. Celles-ci vont cliver la protéine pro-apoptotique Bid (*BH3-Interacting domain death agonist*) (Yamada *et al.*, 1999; Milhas *et al.*, 2005). La forme clivée t-Bid migre dans la membrane mitochondriale externe (MME) et déclenche le changement de conformation des membres pro-apoptotiques Bax et Bak (Gross *et al.*, 1999). Cela entraîne l'insertion de Bax et l'oligomérisation de Bax et de Bak dans la MME (Eskes *et al.*, 2000; Wei *et al.* 2000; Billen *et al.*, 2008a). Les complexes de Bax et Bak vont ainsi former des pores dans la MME et permettre le relargage cytosolique de facteurs pro-apoptotiques strictement mitochondriaux et initialement séquestrés dans la mitochondrie. Parmi ces facteurs pro-apoptotiques on retrouve notamment le cytochrome-c et smac/Diablo (figure 7) (Westphal *et al.*, 2010).

Les protéines Bim (*Bcl-2-interactiong mediator of cell death*) et PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), très similaires à la forme tronquée de Bid, sont également capables d'activer Bax et Bak de façon directe (Kim *et al.*, 2006). Bim et PUMA ne sont pas aussi impliqués que Bid dans l'apoptose induite par TRAIL, mais ils peuvent néanmoins jouer un rôle positif sur la signalisation (Han *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2013).

L'apoptosome

Le cytochrome-c cytosolique interagit avec la protéine Apaf-1 et la caspase-9 pour former un complexe appelé apoptosome. La caspase-9 est clivée et activée à l'intérieur de ce complexe et est capable d'activer à son tour les caspases effectrices comme la caspase-3 (Li *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1999). La procaspase-9 a plus d'affinité pour l'apoptosome que la caspase-9 active ce qui permet une rotation/activation des procaspases 9 (Malladi *et al.*, 2009).

En plus d'initier le démantèlement de la cellule, la caspase-3 est capable d'activer à son tour les caspases initiatrices 8 et 10 ainsi que la caspase-9 (Yang *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2003). La mitochondrie permet donc d'amplifier le signal apoptotique par une boucle d'amplification.

Les facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux

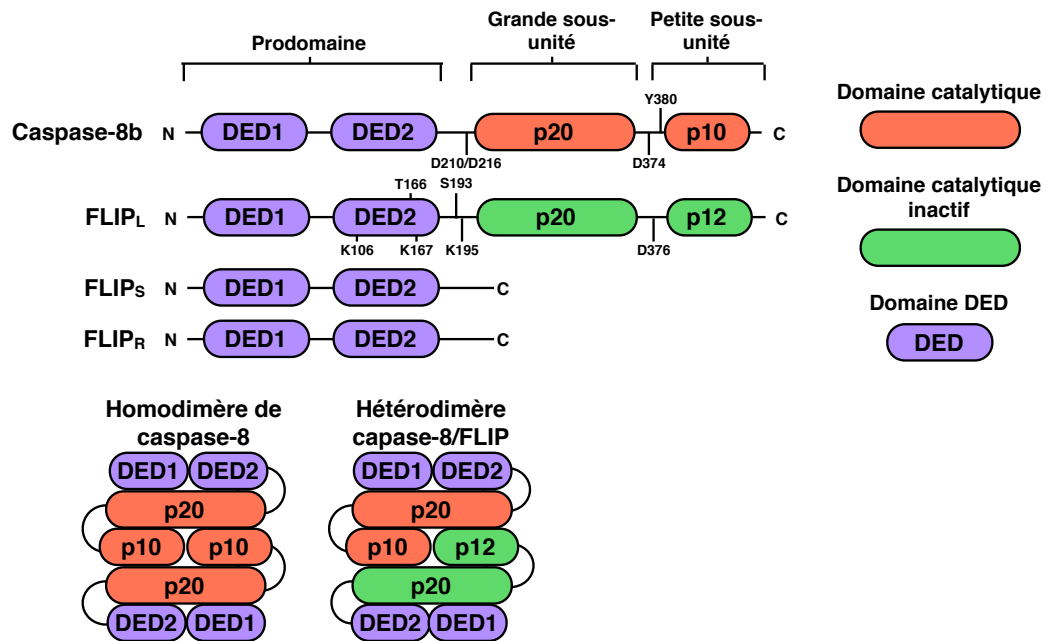


Figure 9. Structure de FLIP

FLIP est une protéine homologue et un inhibiteur de la caspase-8 produit sous la forme de trois isoformes. FLIP_L possède un domaine catalytique inactif (*caspase-like*), FLIP_S et FLIP_R ne possèdent pas de domaine catalytique.

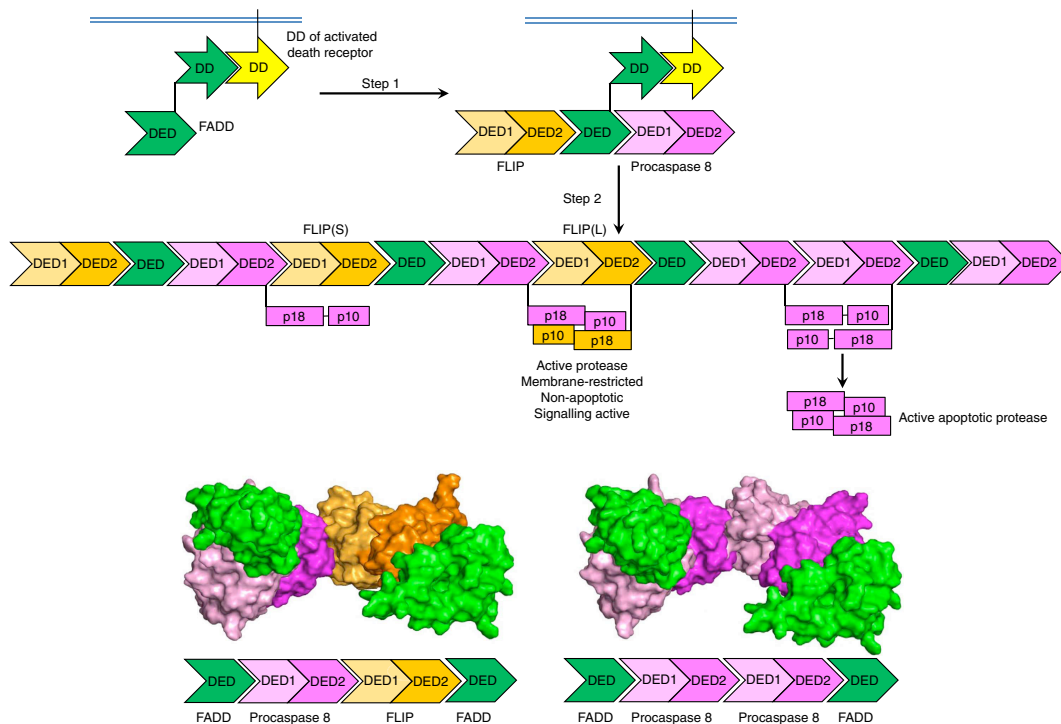


Figure 10. Modèle structural d'action de FLIP_L et de FLIP_S dans le DISC

Le modèle de Majkut *et al.* propose un recrutement de la caspase-8 (en rose) sur le DED de FADD (en vert) d'un côté différent à celui de FLIP (en jaune). L'activation de la caspase-8 se fait par dimérisation suite à des interactions entre les DED1 et les DED2 des caspases-8. FLIP interagit également avec la caspase-8 via leur DED1 et 2 respectifs. Il en résulte une activation partielle de la caspase-8 suite au recrutement de FLIP_L et pas d'activation de la caspase-8 suite au recrutement de FLIP_S. (Adapté de Majkut *et al.*, 2014)

Outre le cytochrome c, de nombreux facteurs pro-apoptotiques sont relargués de la mitochondrie une fois que la MME est devenue perméable, ce qui participe à l'initiation et/ou l'amplification du processus apoptotique. Parmi ces facteurs, Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 inhibent les protéines IAP (*inhibitor of apoptosis*) dont XIAP (Verhagen *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2002; van Loo *et al.*, 2002), tandis que la protéine AIF et l'endonucléase-G se relocalisent dans le noyau pour condenser la chromatine et cliver l'ADN (Susin *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001).

C. Les mécanismes de régulation de l'apoptose

a) FLIP - Un inhibiteur majeur de la voie extrinsèque.

Structure et découverte de FLIP

FLIP (c-FLIP/Casper/i-FLICE/MRIT/FLAME-1/CLARP) est une protéine homologue et le principal inhibiteur des caspases initiateuses 8 et 10 et par conséquent de la voie TRAIL. Treize variants transcrits pour trois isoformes produites à l'état de protéine ont été identifiés : FLIP_L (*Large isoform* - 55 kDa), FLIP_S (*Small isoform* - 26 kDa) et FLIP_R (*Raji isoform* - 24 kDa) (figure 9). FLIP_L possède une structure très similaire à la caspase-8 avec deux DED en N-ter et un domaine *caspase-like* en C-ter dont le site catalytique est inactif par le manque de certains résidus d'acides aminés critiques pour son activité (figure 9) (Shu *et al.*, 1997). Les isoformes FLIP_S et FLIP_R possèdent seulement deux DED suivis qu'une courte séquence peptidique impliquée dans leur ubiquitination et leur dégradation (Poukkula *et al.*, 2005). Toutes les isoformes peuvent être recrutées dans le DISC via leurs DED respectifs et inhibent l'induction du signal apoptotique (Jin *et al.*, 2004 ; Panner *et al.*, 2007 ; Ueffing *et al.*, 2008; Shirley et Micheau, 2010). Néanmoins, FLIP_L semble être l'isoforme la plus complexe et la plus étudiée. C'est également la seule dont l'expression a été corrélée à un mauvais pronostic, l'étude étant portée sur le cancer colorectal (Ullenhag *et al.*, 2007).

FLIP_L a la particularité d'avoir été découvert simultanément par plusieurs équipes de recherche et décrit à la fois pour un rôle pro- et anti-apoptotique suivant l'équipe en question (Gosltsev *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1997; Shu *et al.*, 1997; Srinivasula *et al.*, 1997). A l'heure actuelle, FLIP_L est unanimement considéré comme un régulateur anti-apoptotique majeur de l'apoptose extrinsèque dont l'inhibition présente un

enjeu important pour les thérapies anti-cancéreuses (Fulda, 2013; Shirley et Micheau., 2010).

FLIP et l'apoptose induite par TRAIL

FLIP restreint ou inhibe l'activation et l'activité de la caspase-8 dans le DISC et dans le cytoplasme en formant des hétérodimères partiellement ou non fonctionnels (figure 9). Le pouvoir inhibiteur de FLIP est très important malgré une faible quantité intracellulaire, suggérée par Scaffidi et son équipe comme étant cent fois inférieure à la quantité de caspase-8 (Scaffidi *et al.*, 1999). Cela peut être expliqué par le fait que FLIP_L forme des hétérodimères avec la caspase-8 plus stables que les homodimères de caspase-8 et que ceux-ci sont préférentiellement recrutés dans le DISC (Micheau *et al.*, 2002). Une étude récente a conforté cette idée en montrant que le recrutement de FLIP_L et de la caspase-8 se fait différemment sur FADD, cependant les auteurs estiment que les quantités de FLIP et de caspase-8 recrutés sont comparables (figure 10) (Majkut *et al.*, 2014). Également, en cohérence avec le modèle d'activation et de recrutement en chaîne de la caspase-8, une seule molécule de FLIP pourrait inhiber la formation d'une chaîne et compromettre l'activation de plusieurs pro-caspase-8 (Dickens *et al.*, 2012).

Un hétérocomplexe composé de la caspase-8 et de FLIP_S est inactif. Cependant, au sein d'un hétérocomplexe entre la caspase-8 et FLIP_L, la caspase-8 devient active pour certains substrats. Cela lui permet de cliver des cibles proches telles que RIP1 (en un fragment p42), FLIP_L (en un fragment p43) ou une autre caspase-8 (en un fragment p43/p41) (Micheau *et al.*, 2002; Feoktistova *et al.*, 2011). Ainsi, plusieurs études ont montré que FLIP_L peut augmenter l'activité de la caspase-8 (Micheau *et al.*, 2002; Dohrman *et al.*, 2005; Oberst *et al.*, 2011). En ce sens, une étude a mis en évidence que la présence de FLIP_L dans les cellules cancéreuses leur permet d'être protégées de l'apoptose induite par TRAIL en dépit de l'augmentation de l'activité de la caspase-8 car cette dernière reste prisonnière du DISC et ne peut activer les caspases effectrices dans le cytosol (Micheau *et al.*, 2002). Ceci est une différence notoire entre les différentes isoformes de FLIP.

FLIP et la nécroptose

La nécroptose, également appelée nécrose programmée, est une mort cellulaire récemment décrite au niveau moléculaire dans laquelle FLIP et la caspase-8 possèdent

un rôle déterminant (He *et al.*, 2013 ; Gong *et al.*, 2013). Cette voie de signalisation peut être induite par TRAIL dans certaines conditions (Meurette *et al.*, 2007; Jouan-Lanhouet *et al.*, 2012). FLIP et la caspase-8 sont recrutés au sein d'un complexe appelé le ripoptosome, celui-ci se forme notamment à la suite d'un stress génotoxique et en l'absence de IAP fonctionnels (Tenev *et al.*, 2011; Abhari *et al.*, 2012). Brièvement, RIP1 normalement dégradé par les IAP constitue une plateforme avec FADD et les caspases 8 et 10 lorsque que les IAP sont inhibés, ce qui déclenche une mort de type nécrotique via l'activation de la kinase RIP3. Un équilibre a été décrit entre l'apoptose et la nécroptose, par l'intermédiaire de la caspase-8 ou de RIP1, qui mène dans tous les cas à la mort de la cellule de manière dépendante ou non des caspases (Feoktistova *et al.*, 2012). FLIP peut être recruté dans le ripoptosome et régule la signalisation différenciellement selon l'isoforme. En effet, l'hétérodimère caspase-8/FLIP_L catalytiquement actif permet le clivage de RIP1 et la dissociation du ripoptosome tandis que l'hétérodimère caspase-8/FLIP_S inactif au contraire favorise la formation du ripoptosome (Feoktistova *et al.*, 2011 ; Tenev *et al.*, 2011).

Régulation et modifications post-traductionnelles de FLIP

L'efficacité de FLIP en tant qu'inhibiteur de l'apoptose extrinsèque est contrebalancée par une courte durée de vie ainsi que de multiples modifications post-traductionnelles pouvant mener à sa dégradation. La dégradation de FLIP concerne toutes ses isoformes, elle est dépendante du système ubiquitine/protéasome et peut être provoquée par sa phosphorylation (Zhang *et al.*, 2005; Palacios *et al.*, 2006).

Le TNF α , via l'activation des MAPKinases (JNK et p38) et des E3 ubiquitines ligases ITCH et c-Cbl, peut induire la dégradation de FLIP_L par l'ubiquitination des lysines 167 et 195 (Chang *et al.*, 2006; Kundu *et al.*, 2009). Également, les dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*) ont été montrés capables de dégrader FLIP en induisant sa phosphorylation sur la thréonine 166 puis son ubiquitination sur la lysine 167 (Wilkie-Grantham et Matsuzawa, 2013). Par ailleurs, FLIP a été montré pouvant être dégradé à la suite d'un choc thermique par l'ubiquitination de la lysine 195 (Song *et al.*, 2013a).

Inversement, les PKC alpha et beta sont capables de phosphoryler les isoformes de FLIP sur la sérine 193 et d'inhiber leur ubiquitination, ce qui se traduit par un gain de stabilité pour FLIP_S (Kaunisto *et al.*, 2009). En ce sens, l'inhibition de la kinase GSK3

titre le TRAIL soluble dans la matrice. Différentes régulations peuvent se faire au niveau du DISC par des modifications de la caspase-8, par la présence de RIP1 ou de FLIP mais également par la régulation de l'activité des caspases par les IAP.

Les modifications post-traductionnelles de la caspase-8

La caspase-8 étant cruciale pour la voie TRAIL, celle-ci peut être la cible de modifications post-traductionnelles modulant son activité. Par exemple, la caspase-8 peut être phosphorylée sur la tyrosine 380 par la kinase Src, ce qui inhibe son activité apoptotique et induit la migration cellulaire (Cursi *et al.*, 2006; Senft *et al.*, 2007). Également, FAT1, une protéine de la famille des cadhérines, régule négativement la voie de TRAIL en séquestrant la caspase-8 et en empêchant son recrutement et son activation au sein du DISC (Kranz *et al.*, 2014). Inversement, l'ubiquitination de la caspase-8 par la Culline-3 semble être très importante pour son activation (Jin *et al.*, 2009).

L'implication de RIP1

Outre son rôle central dans le ripoptosome et l'induction de la mort cellulaire par la nécroptose, RIP1 (*receptor-activating protein 1*) ou RIPK1 est une sérine/théonine kinase décrite pour être recrutée dans le DISC et pour son rôle protecteur dans l'apoptose induite par TRAIL (Chaudhary *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2007a; Huang *et al.*, 2013). RIP1 est également présent dans les complexes secondaires du TNF et de TRAIL ce qui favorise le clivage de la caspase-8 (Micheau et Tschopp, 2003; Jin et El-Deiry, 2006). Également, dans le cas d'un blocage de la voie apoptotique, TRAIL induit la migration des cellules ce qui pourrait être de manière dépendante de RIP1 et par l'intermédiaire de TRAIL-R2 (Azijli *et al.*, 2012). Cette migration pourrait également être dépendante de la caspase-8 (Helfer *et al.*, 2006; Senft *et al.*, 2007). RIP1 est également nécessaire à l'activation des voies anti-apoptotiques NF- κ B et JNK induite par TRAIL (Lin *et al.*, 2000; Matsuda *et al.*, 2014). Par ailleurs, une équipe défend l'idée surprenante que l'inhibition de la caspase-8 par FLIP dans le DISC est dépendante de RIP1 (Song *et al.*, 2007).

Le rôle des IAP

Les IAP (*inhibitor of apoptosis*) représentent une famille de 8 protéines dont les plus connues sont XIAP, cIAP1 et cIAP2. Elles ont été découvertes pour leur rôle anti-

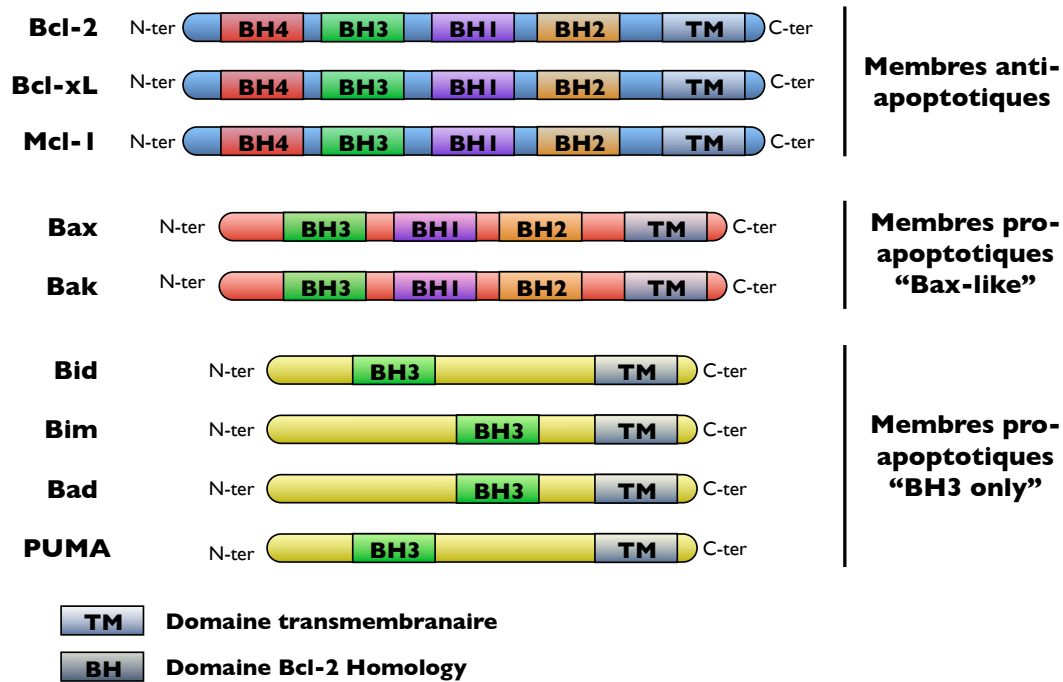


Figure 12. Structure des membres pro- et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2

Structure et liste non exhaustive des protéines de la famille de Bcl-2. Ces protéines possèdent toutes un domaine transmembranaire leur permettant de s'insérer dans la membrane mitochondriale externe ainsi que un ou plusieurs domaines d'interaction de type BH (*Bcl-2 homology*).

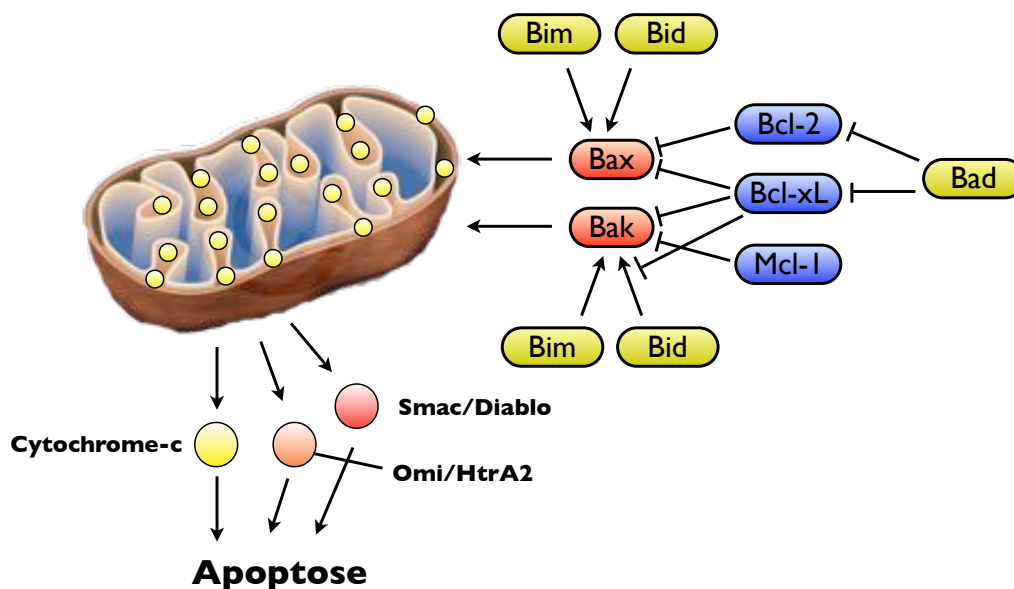


Figure 13. Interactions entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2

L'activation de la mitochondrie est régulée par les protéines de la famille de Bcl-2. Les membres Bax et Bak forment des pores dans la membrane mitochondriale externe (MME) et permet la libération cytosolique du cytochrome-c, de Omi/HtrA2 et de Smac/Diablo. Bid et Bim activent Bax et Bak. Bcl-2 inhibe Bax, Mcl-1 inhibe Bak et Bcl-xL inhibe Bax, Bak et Bid. Bad inhibent Bcl-2 et Bcl-xL.

apoptotique avant d'être décrites pour leur implication dans différents mécanismes tels que la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire (Dubrez-Daloz *et al.*, 2008).

Leurs rôles anti-apoptotiques font appel à divers mécanismes. Par exemple, XIAP a la capacité de se lier et d'inhiber les caspases 3 et 7 ainsi que la caspase-9 (Deveraux *et al.*, 1999; Chai *et al.*, 2001b; Riedl *et al.*, 2001; Bratton *et al.*, 2001). XIAP se lie directement à la caspase-9 en se liant à la petite sous-unité de la caspase-9 et par son domaine de dimérisation, ce qui a pour effet de bloquer son activité caspase (Srinivasula *et al.*, 2001; Shiozaki *et al.*, 2003; Eckelman et Salvesen, 2006a). cIAP1 et cIAP2 peuvent également interagir avec les caspases 3 et 7, cependant cette interaction n'inhibe pas leur activité (Tenev *et al.*, 2005; Eckelman et Salvesen, 2006b). Leur activité anti-apoptotique est également expliquée par le fait que les IAP peuvent ubiquitinyler les tétramères actifs des caspases et induire leur dégradation par le protéasome (Suzuki *et al.*, 2001; Tenev *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2009; Galban *et al.*, 2010). Par ailleurs, via son activité *E3 ubiquitin ligase*, cIAP1 peut ubiquitiner RIP1 et induire sa dégradation, ce qui a pour effet de protéger les cellules de la nécroptose (McComb *et al.*, 2012)

c) Les régulations de la voie intrinsèque

Les régulations de l'activation de la mitochondrie dépendent essentiellement de la famille de protéines de Bcl-2 qui comprend 25 gènes, et dont les interactions permettent ou non la formation de pores dans la membrane mitochondriale externe (MME) et l'amplification du signal apoptotique. Ces membres sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs domaines BH (*Bcl-2 homology domain*) importants pour leurs interactions et leurs fonctions (figure 12) (Vela *et al.*, 2013). Les membres de la famille de protéines de Bcl-2 ont un rôle soit pro- soit anti-apoptotique.

Parmi les membres anti-apoptotiques on compte entre autres Bcl-2, Bcl-xL ou encore Mcl-1. Leur fonction est d'inhiber l'activation de Bax et de Bak par une interaction directe et de prévenir la formation de pores dans la MME (LeBlanc *et al.*, 2002). Bcl-2 possède une forte affinité pour Bax et inhibe spécifiquement cette protéine (figure 13) (Diaz *et al.*, 1997). A l'inverse, Mcl-1 inhibe préférentiellement Bak (Willis *et al.*, 2005; Gillissen *et al.*, 2010). Bcl-xL, a une action plus globale par la séquestration de t-Bid et par l'inhibition de Bax et de Bak (Sattler *et al.*, 1997; Billen *et al.*, 2008b).

Nom	Modification / Tag	Application	Référence
TRAIL.0	Non modifiée	Induction de l'apoptose	Ashkenazi <i>et al.</i> , 1999
His-TRAIL	Ajout d'une queue poly-histidine	Faciliter la purification, la trimérisation, l'activité	Pitti <i>et al.</i> , 1996
LZ-TRAIL	Ajout d'une fermeture éclair à leucine	Faciliter la purification, la trimérisation, l'activité et la stabilité	Walczak <i>et al.</i> , 1999
FLAG-TRAIL	Ajout d'un Tag FLAG	Faciliter la purification, permet une multimérisation avec un anti-FLAG	Schneider, 2000
iz-TRAIL	Ajout d'une fermeture éclair à isoleucine	Faciliter l'oligomérisation et donc l'activité	Ganten <i>et al.</i> , 2006
scFv-sTRAIL	Protéine de fusion	Augmentation de la spécificité et de la réponse	Wajant <i>et al.</i> , 2013
HSA-Flag-TNC-TRAIL	Protéine de fusion TRAIL avec l'albumine sérique	Augmentation de la demié vie	Muller <i>et al.</i> , 2010
Nanoparticle-TRAIL	Conjugaison de TRAIL et de nanoparticules ferriques	Augmentation de l'activité anti-tumorale	Perlstein <i>et al.</i> , 2013

Tableau 2. Formes recombinantes de TRAIL

Liste non exhaustive des formes recombinantes de TRAIL.

Bad est un régulateur pro-apoptotique de Bcl-xL, il se lie à celui-ci, permet le relargage de t-Bid et inhibe son interaction avec Bax (Lovell *et al.*, 2008).

5. Utilisation de TRAIL en thérapie

Ses propriétés anti-cancéreuses ont fait de TRAIL un candidat intéressant en thérapie. Les molécules ciblant la voie de TRAIL ont déjà fait l'objet de nombreuses études précliniques qui ont conforté l'intérêt thérapeutique qui lui est porté, mais ont également révélé les limites d'une utilisation en monothérapie. Cette partie a pour objectif de détailler les différentes formes de TRAIL et ses dérivés qui ont été développés tout en résumant les avantages et les limites de ces molécules dans leurs applications thérapeutiques.

A. Les formes recombinantes de TRAIL

De nombreuses versions de TRAIL ont été créées par diverses équipes, elles sont résumées dans le tableau 2. Les versions divergent selon leur mode de production et leurs caractéristiques comme leur efficacité ou leur toxicité.

a) Les versions classiques

La forme recombinante la plus simple du TRAIL soluble générée a été appelée TRAIL.0 (ou Apo2L.0). Celle-ci contient seulement un atome de zinc pour stabiliser la protéine sous sa forme trimérique, donnant à la protéine son activité biologique. Deux études précliniques chez la souris et les primates ont montré que les injections successives intraveineuses du TRAIL.0 induisent un effet cytostatique significatif sur des lignées cancéreuses issues de tumeurs de colon, de poumon, de sein, de rein et du système nerveux sans provoquer de sévère toxicité. Cet effet peut être en synergie avec des agents chimiothérapeutiques dont le 5-Fluorouracile (Ashkenazi *et al.*, 1999; Kelley *et al.*, 2001).

Un des inconvénients du TRAIL.0 est sa durée de vie très limitée en circulation dans le sang (environ 30 à 60 minutes chez l'humain) avant d'être éliminé par les reins, ce qui limite son efficacité et nécessite des injections répétées (Herbst *et al.*, 2010).

Des versions modifiées du TRAIL.0 par des mutations ponctuelles ont été produites afin d'augmenter la spécificité du ligand pour ses récepteurs agonistes (TRAIL-R1/-R2) vis-à-vis de ses récepteurs antagonistes (TRAIL-R3/-R4) (Kelley *et al.*, 2005; MacFarlane *et al.*, 2005; Van der Sloot *et al.*, 2006). Aucune donnée préclinique n'a pour l'instant été apportée concernant l'efficacité de ces constructions modifiées, ni leur intérêt par rapport à la version recombinante classique.

b) Les versions étiquetées

Une étiquette (ou *tag*) est une courte séquence d'acides aminés placée à l'extrémité N- ou C-terminale d'une protéine. La présence d'une étiquette facilite l'étude et l'étape de purification dans la production d'une protéine recombinante. Pour cette raison, les premières versions de TRAIL recombinant produites étaient *étiquetées* avec : une queue polyhistidine (His-TRAIL) (Pitti *et al.*, 1996), une fermeture éclair à leucine (*leucine zipper* - LZ) (Walczak *et al.*, 1999) ou encore une étiquette FLAG (FLAG-TRAIL) (Schneider, 2000).

Les étiquettes polyhistidine et LZ permettent une meilleure stabilité *in vivo* ainsi qu'une pré-oligomérisation du TRAIL ce qui lui confère une activité apoptotique plus importante. Dans le cas du FLAG-TRAIL, celui-ci nécessite d'être agrégé par un anticorps anti-FLAG pour être correctement oligomérisé et induire l'apoptose. Cependant, à l'instar des ligands FasL et TNF, des données précliniques du His-TRAIL et du LZ-TRAIL ont montré une certaine toxicité respectivement pour des hépatocytes et pour des kératinocytes (Lawrence *et al.*, 2001).

B. Les anticorps agonistes

Des anticorps spécifiques des récepteurs agonistes TRAIL-R1 et TRAIL-R2, induisant l'apoptose de manière similaire au ligand, ont été développés et présentent différents avantages par rapport au TRAIL recombinant.

L'efficacité de TRAIL en tant que thérapie peut être diminuée par la présence de ses récepteurs agonistes TRAIL-R3/4 à la surface des cellules cancéreuses, ce qui n'est pas le cas des anticorps spécifiques qui ne reconnaissent qu'un seul récepteur. Ceux-ci ont également l'avantage d'avoir une demi-vie plasmatique plus importante que les formes

recombinantes de TRAIL (Plummer *et al.*, 2007). De plus, il a été montré que certains anticorps ont la capacité d'augmenter la réponse immunitaire et la phagocytose des cellules tumorales (Presta, 2002). Ces anticorps ont cependant l'inconvénient de n'être spécifique que de l'un des deux récepteurs agonistes, ce qui peut s'avérer délétère dans le cas de cellules cancéreuses capables d'engager l'apoptose que par l'un ou l'autre des récepteurs agonistes.

Actuellement, plusieurs anticorps sont en cours d'essais cliniques dont le tigatuzumab ou le lexatumumab et dont le plus intéressant est le mapatumumab (Plummer *et al.*, 2007; Forero-Torres *et al.*, 2013). Le mapatumumab est le seul anticorps agoniste dirigé contre TRAIL-R1, il est développé par la compagnie *Human Genome Sciences*. Les études cliniques de phase I ont montré que le mapatumumab induit peu de toxicité en injection intraveineuse à 10 mg/kg et a une demi-vie de 14 jours chez les patients en phase IV de développement de cancers solides (Tolcher *et al.*, 2007; Hotte *et al.*, 2008). Les études cliniques de phase II n'ont pas montré d'effet intéressant du mapatumumab seul injecté à 10 mg/kg tous les 14 jours, mais celles-ci ont permis d'observer une stabilisation de cas avancés de cancers du poumon à non petites cellules en combinaison avec des agents de chimiothérapie classique (Greco *et al.*, 2008). Des observations similaires ont été faites sur des cas avancés de cancers colorectaux (Trarbach *et al.*, 2010). Une étude sur les lymphomes folliculaires non-Hodgkiniens a montré une réponse clinique intéressante au mapatumumab chez trois patients sur quarante atteints, deux avec une rémission complète (Younes *et al.*, 2010).

C. Les autres formes de TRAIL

Afin d'allonger sa stabilité *in vivo*, certaines versions de TRAIL ont été liées de manière covalente à des molécules dont la durée de vie dans le plasma est intéressante. Des ligands TRAIL liés à l'albumine sérique ou à un polyéthylène glycol ont été produits dans cet objectif (Muller *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011a).

Une forme mutée et circulaire de TRAIL (CPT) a été développée et a récemment montré des résultats très prometteurs en phase II d'essai clinique (Fang *et al.*, 2005; Geng *et al.*, 2014). Sur 41 des patients atteints de myélomes multiples, le CPT en combinaison avec le thalidomide a eu une efficacité de 22% avec 2 rémissions complètes, 3 rémissions presque complètes et 4 réponses partielles.

Récemment, des formes non conventionnelles et ambitieuses de traitement ont été développées utilisant des virus codant pour une forme soluble de TRAIL. L'intérêt de ces méthodes est d'avoir une biodisponibilité plus stable et plus adaptée à certains cas particuliers comme les gliomes (Kim *et al.*, 2011b). Les adénovirus ont montré des résultats intéressants en combinaison avec le cisplatine dans une étude préclinique chez des souris atteintes d'un carcinome épidermoïde, mais ceux-ci présentent le désavantage d'être limités dans leur capacité à transporter une grande quantité d'ADN (Jiang *et al.*, 2011a). L'utilisation de lentivirus pourrait pallier à ce problème et permettre le transfert de plusieurs gènes ou séquences d'intérêt comme cela a été fait chez la souris pour une séquence suppressive de *Bcl-2* en plus du gène codant pour TRAIL (Kock *et al.*, 2007).

L'utilisation de particules virales pour la distribution de TRAIL a montré une efficacité et un potentiel thérapeutique prometteur mais doit prouver son innocuité et préciser ses applications cliniques concrètes.

Pour conclure sur cette partie, TRAIL est disponible sous de nombreuses formes dont certaines présentent une toxicité et une biodisponibilité intéressante. Néanmoins, le pouvoir anti-cancéreux de TRAIL et de ses dérivés se limite dans la plupart des cas à un effet cytostatique lorsqu'il est utilisé seul, ce qui ne permet pas d'envisager de traitement en monothérapie. Une combinaison avec la chimiothérapie se présente comme plus intéressante sans que la réponse sur des stades avancés de cancers soit singulière.

II. Les protéines de choc thermique (HSP) - Classification et fonctions

Les protéines de choc thermique, ou protéines de stress, ont été découvertes sur le modèle *Drosophila melanogaster* dont les larves exposées à une élévation de la température occasionne une synthèse importante d'ARN messagers (Ritossa *et al.*, 1962; Jamrich *et al.*, 1977). L'identification des gènes induits a conduit à la description des protéines de la famille des HSP (Tissieres *et al.*, 1974). Par la suite, il a été montré que les HSP étaient induites par différents types de stress tels que des stress oxydatifs ou induits par des métaux lourds (Bournias-Vardiabasis et Buzin, 1986; Drummond et Steinhardt, 1987).

Depuis leur découverte, un nombre croissant d'HSP ont été décrites. La dénomination et la classification des HSP restent des sujets complexes et toujours discutés. Une des classifications, proposée par Kampinga et son équipe organise les HSP en sept familles en fonction de leur poids moléculaire (Kampinga *et al.*, 2009) : HSPH/HSP110 ; HSPC/HSP90 ; HSPA/HSP70 ; HSPD/HSP60 ; DNAJ/HSP40 ; HSPB/sHSP (*small HSP* - les petites HSP) ; HSPE/HSP10. Bien que les HSP partagent des propriétés communes, chaque membre et chaque famille possèdent des caractéristiques propres au niveau de leur localisation, leur nature inductible, leurs clients, leurs mécanismes d'action, ou leur dépendance à l'ATP.

Cette partie a dans un premier temps pour but de renseigner sur les origines d'un stress cellulaire et sur le rôle général des HSPs dans ce contexte. Dans un deuxième temps, cette partie a pour objectif de détailler la structure et les fonctions dans l'apoptose et la réponse au stress de trois familles d'HSP à travers leur membre principal, à savoir HSP27 (sHSP), HSP70 (HSP70) et HSP90 (HSP90).

1. Les HSP dans la réponse au stress

Les cellules et en particulier les cellules cancéreuses, sont soumises à diverses agressions qui les mettent en état de stress et menacent leur homéostasie et leur fonctionnement. Cet état de stress peut être provoqué par de nombreux facteurs physico-chimiques environnementaux (choc thermique, oxydant, irradiations) (Diller, 2006), par l'exposition de molécules toxiques (métaux lourds, alcool, chimiothérapie) (Unno *et al.*, 2002a) ou encore certaines conditions physiologiques (inflammation, système immunitaire) (Chovatiya et Medzhitov, 2014). Ces stress perturbent leur fonctionnement en

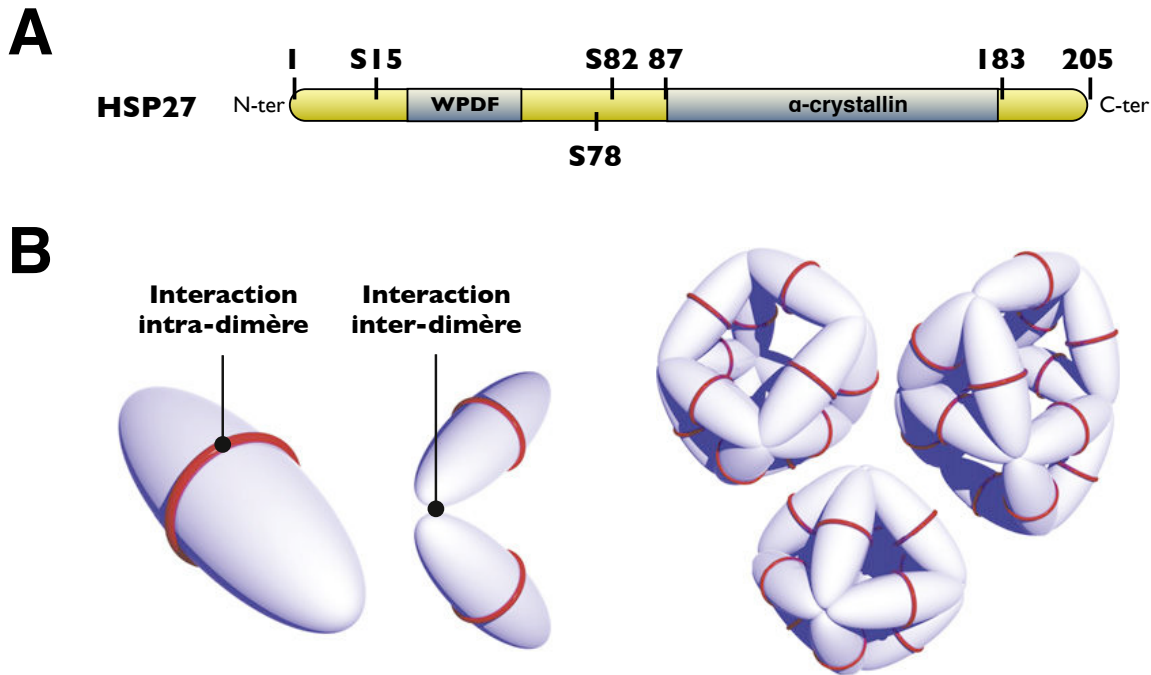


Figure 14. Structure et oligomérisation d'HSP27

A. Schéma représentatif de la séquence d'HSP27. celle-ci comporte dans sa séquence un motif WPFD ainsi que trois sérines phosphorylables importantes dans la régulation de son oligomérisation.

B. Modèle d'oligomérisation de l' α B-crystallin, l'homologue d'HSP27, proposé par Baldwin et son équipe. Le dimère est l'unité de base des grands oligomères et s'assemble de manière à correspondre à leur cible. (Adapté de Baldwin *et al.* 2011)

modifiant les molécules qui les constituent (métabolites, protéines, matériel génétique etc.), ce qui engendre une réponse. Par exemple, lors d'un choc thermique, les liaisons faibles stabilisant la structure spatiale des protéines sont affectées, ce qui provoque leur dénaturation (Nguyen *et al.*, 1989; Cordier et Grzesiek, 2002). Les protéines dénaturées ne sont plus fonctionnelles et peuvent perturber le fonctionnement de la cellule, ce qui induit une réponse au stress notamment par l'expression des protéines de choc thermique (Mifflin et Cohen, 1994).

Les HSP sont impliquées dans la survie de la cellule et dans le rétablissement de l'homéostasie cellulaire au cours et après un stress par leur fonction de « chaperon moléculaire ». Cette notion fut introduite après l'observation de la capacité de ces protéines à prévenir des interactions inappropriées entre protéines (Ellis *et al.*, 1987). Les HSP sont capables d'interagir avec les protéines dénaturées afin de prévenir la formation d'agrégats protéiques, et d'assister des nouvelles protéines ou les protéines dénaturées dans le recouvrement de leur structure tridimensionnelle native (Burel *et al.*, 1992).

2. La famille des petites protéines de stress (sHSP) - HSP27

Mis à part leur taille, les sHSP représentent une famille hétérogène caractérisée par une activité indépendante de l'ATP. Elles possèdent un domaine α -crystallin d'environ 90 acides-aminés en C-terminal, très conservé entre les membres et qui leur confère la capacité de se dimériser (figure 14A et B) (Ingolia et Craig, 1982, Kim *et al.*, 1998). De cette capacité découle une des caractéristiques atypiques des sHSP à savoir leur capacité à s'oligomériser. Ainsi, les sHSP modulent leur structure quaternaire et s'assemblent de mono- ou dimères en complexes pouvant aller jusqu'à 800 kDa pour une trentaine d'unités, ce qui leur permet de moduler leur fonction (figure 14B) (Bruey *et al.*, 2000a; Kumar et Rao, 2000; Benesch *et al.*, 2008; Paul *et al.*, 2010).

Cette partie a pour objectif de détailler les fonctions et les caractéristiques du membre des sHSP, HSP27

A. Structure, modifications et oligomérisation d'HSP27

Structure

HSP27/HSPB1/HSP28 a été décrit historiquement pour être induit lors d'un choc thermique dans la lignée cellulaire HeLa (Hickey et Weber, 1982). HSP27 est une protéine de 205 acides aminés qui possède une partie N-ter pouvant être phosphorylée, un domaine α -crystallin en C-ter essentiel à sa dimérisation et son oligomérisation (Lambert *et al.*, 1999) et une queue flexible de 22 acides aminés à l'extrémité C-ter (figure 14A). HSP27 peut également former des dimères par un pont di-sulfure via la cystéine 137 située au sein du domaine α -crystallin, ce qui contribue à la stabilité des dimères (Zavialov *et al.*, 1998). Enfin, le rôle de la partie flexible de 22 acides aminés en C-ter reste à ce jour inconnu, cependant il a été suggéré que cette partie interagissait avec les protéines clientes (Lelj-Garolla et Mauk, 2005).

Phosphorylation et oligomérisation

La partie N-ter contient des séquences déterminantes dans la régulation de son oligomérisation. En effet, plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés, principalement les serines 15, 78 et 82 (Stokoe *et al.*, 1992; Rogalla *et al.*, 1999). Plusieurs études montrent l'implication de la p38 MAPK et de sa voie dans la

phosphorylation d'HSP27. Notamment les MAPKAP 2/3 (MK2) en aval de la voie p38 ciblent les sérines 15, 78 et 82 ce qui a pour effet de réduire la taille des oligomères d'HSP27 (Stokoe *et al.*, 1992; Rouse *et al.*, 1994; Rogalla *et al.*, 1999; Rousseau *et al.*, 2006; Clements *et al.*, 2011). La PP2A (*protein phosphatase 2A*) et en moindre mesure la PP2B sont capables de déphosphoryler la p38 MAPK et par conséquent d'inhiber la phosphorylation d'HSP27 (Cairns *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2003). L'influence de la phosphorylation d'HSP27 sur son oligomérisation a également été montrée in vitro par la production de mutants. Ainsi, le triple mutant non phosphorylable d'HSP27, où les sérines ont été substituées par des alanines forme de grands oligomères tandis que le triple mutant mimant la phosphorylation où les sérines ont été substituées par des acides aspartiques, forme des petits oligomères (Mehlen *et al.*, 1997; Bruey *et al.*, 2000a). La phosphorylation et l'oligomérisation d'HSP27 sont deux processus liés de manière complexe et dynamique. Cette dynamique dirigée par des étapes de phosphorylation/déphosphorylation successives et transitoires semblent permettre aux oligomères de s'adapter efficacement à leurs cibles (figure 14B) (Paul *et al.*, 2010). Par ailleurs, un motif WDPF a été montré comme essentiel dans la régulation de son oligomérisation et son activation lors d'un choc thermique (Theriault *et al.*, 2004).

Localisation

HSP27 est constitutivement localisé dans le cytoplasme mais sa localisation peut varier en fonction du type cellulaire (Lindquist et Craig, 1988). Lors d'un stress, HSP27 peut changer de localisation et se translocaliser dans le noyau ou dans une zone périnucléaire (Arrigo *et al.*, 1988a; Brunet Simioni *et al.*, 2009; Nadin *et al.*, 2012).

B. Stress et fonctions apoptotiques

Fonctions anti-apoptotiques

HSP27 présente de nombreux rôles anti-apoptotiques centrés autour de l'activation des caspases (Garrido *et al.*, 2006; Lanneau *et al.*, 2007). HSP27 est un facteur anti-apoptotique efficace qui a la capacité de séquestrer et/ou d'inhiber certaines protéines clés de l'apoptose. Ainsi, une simple dérégulation d'HSP27 par interférence à l'ARN est suffisante pour déclencher l'apoptose de lignées cellulaires cancéreuses de cancer de la prostate par l'activation de la caspase-3 (Rocchi *et al.*, 2006). HSP27 interagit directement

avec la procaspase-3 pour inhiber son activation (Voss *et al.*, 2007), mais elle interagit également avec le cytochrome-c, empêchant son recrutement sur Apaf-1, la formation de la l'apoptosome et l'activation de la caspase-9 (Garrido *et al.*, 1999; Bruey *et al.*, 2000b). Une étude a également montré l'interaction d'HSP27 avec Bid, prévenant ainsi l'activation de la mitochondrie par la caspase-8 et le relargage du cytochrome-c (Paul *et al.*, 2002). Par rapport à l'apoptose induite par TRAIL, au moins deux études ont montré que la déplétion d'HSP27 est intéressante pour la sensibilisation à ce traitement (Zhuang *et al.*, 2010; Mellier *et al.*, 2013).

Fonctions anti-stress

Une des fonctions principales d'HSP27 est de protéger de la mort induite par un stress thermique (Trautinger *et al.*, 1997; Chen *et al.* 2007). Cela est notamment expliqué par sa capacité à se lier et à stabiliser les protéines dénaturées ainsi que les agrégats protéiques (Ehrnsperger *et al.*, 1997). La fonction chaperon d'HSP27 ne lui permet pas de réduire la taille des agrégats et de replier correctement les protéines dénaturées, cependant elle prévient leur formation ou l'augmentation de la taille de ces agrégats (Bryantsev *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2009).

Par ailleurs, une des fonctions intéressantes d'HSP27 est de favoriser l'ubiquitination de certaines protéines, comme cela a été montré pour p27Kip1 et I-kB α . Elle interagit directement avec ces protéines et le protéasome, faisant l'intermédiaire et favorisant leur dégradation (Parcellier *et al.*, 2003; Parcellier *et al.*, 2006).

3. La famille d'HSP70

La famille d'HSP70/HSPA est la plus étudiée des protéines de la famille des HSP. Son membre principal, HSP70/HSPA1A, est présent dans tous les organismes et est très conservé entre les espèces (Gupta et Singh, 1994). Cette famille comprend au moins huit membres qui diffèrent par leurs localisations ou leurs fonctions mais présentent entre eux un fort pourcentage d'homologie (Tavaria *et al.*, 1996; Daugaard *et al.*, 2007). On les retrouve majoritairement dans le cytosol et le noyau, toutefois deux membres sont présents dans le réticulum endoplasmique (GRP78/BIP/HSPA5) et la mitochondrie (GRP75/HSPA9). Leur activité est dépendante de l'ATP et leur expression peut être

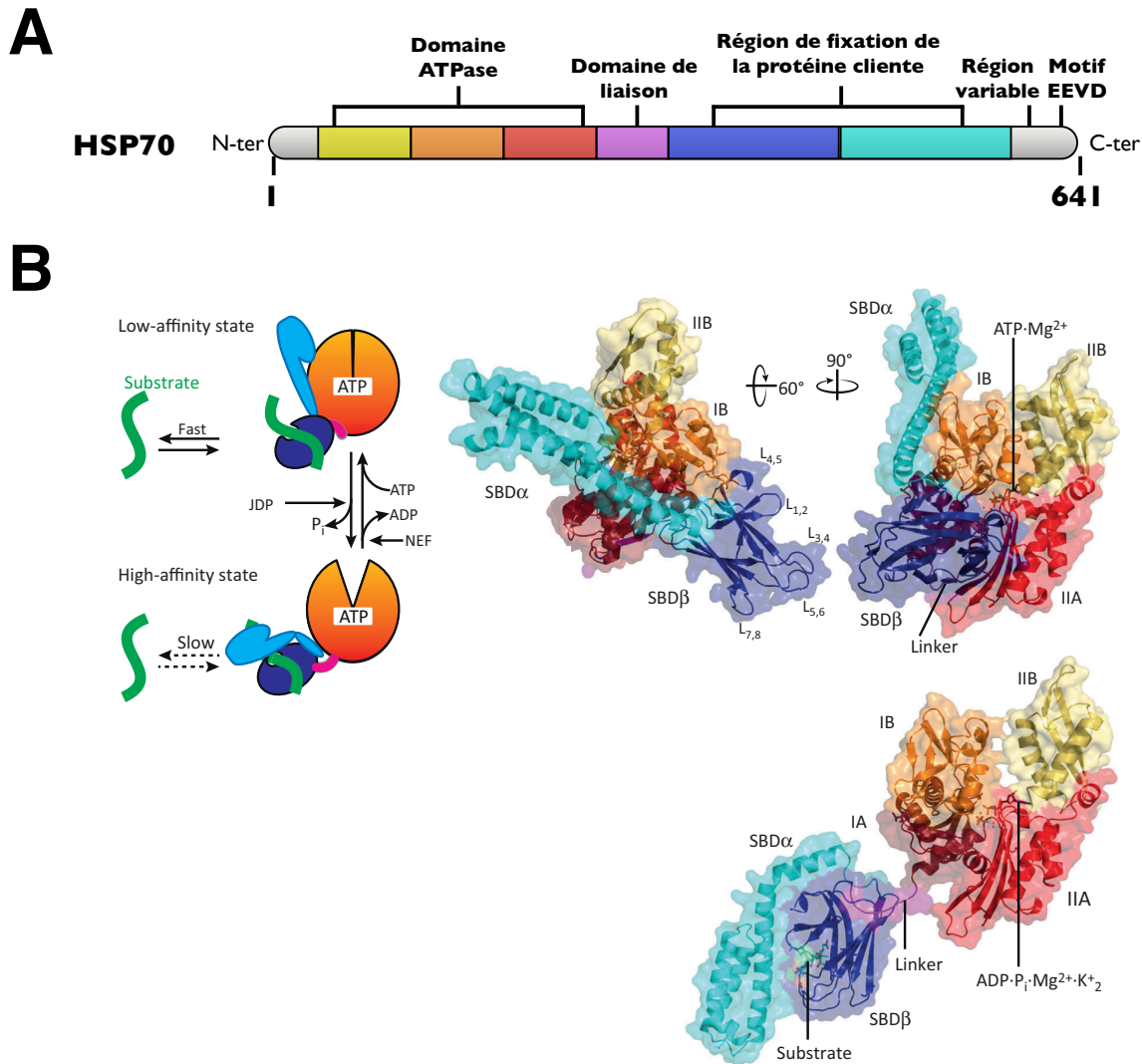


Figure 15. Structure d'HSP70

A. Schéma représentatif de la séquence d'HSP70 qui comporte un domaine ATPase, une région de fixation de la protéine cliente, une région variable et un motif EEVD impliqué dans son interaction avec ses co-chaperon.

B. Représentation schématique d'HSP70 en conformation ouverte et fermée. HSP70 possède une faible affinité pour les peptides lorsque de l'ADP est lié à son site catalytique et une forte affinité pour les peptides lorsque de l'ATP est lié à son site catalytique. Les sous domaines SBDα et SBDβ s'ouvrent et se referment tel une mâchoire sur le peptide à replier (adapté de Mayers, 2013).

constitutive, comme c'est le cas d'HSC70/HSPA8, de GRP78 et de GRP75, ou inductible en conditions de stress, comme c'est le cas d'HSP70/HSPA1A ou d'HSP70-6/HSPA6 (Daugaard et al., 2007). Cette partie a pour objectif de détailler la structure et les fonctions du membre HSP70/HSPA1A.

A. Structure d'HSP70

HSP70 est une protéine de 70 kDa et 641 acides aminés surexprimée dans les cancers. Elle est présente sous deux isoformes partageant 99% d'homologie et issues de deux gènes différents, *HSPA1A* et *HSPA1B*. HSP70 est formée d'un domaine portant la fonction ATPase en N-ter, la fonction chaperon étant portée par un domaine fixant la cible en C-ter. Le domaine chaperon est constitué de feuillets et d'hélices qui, à la suite de l'hydrolyse de l'ATP, se referment comme une mâchoire sur le substrat, permettant un nouveau repliement de celui-ci (figure 15A et B) (Mayer, 2013). À l'extrémité C-ter se trouve le domaine "TKD", formé de 14 acides aminés détectables à l'extérieur de la cellule lorsque HSP70 est inséré dans la membrane (figure 15A). HSP70 étant surexprimé dans les cancers, ce domaine est étudié en tant que marqueur pour le diagnostic et dans le développement de vaccins anti-cancéreux (Li *et al.*, 2009; Stangl *et al.*, 2011; Hromadnikova *et al.*, 2013).

B. Stress et fonctions anti-apoptotiques

Fonctions anti-apoptotiques

HSP70 a une fonction apoptotique très importante et très variée dans les cellules cancéreuses. Elle est considérée comme un inhibiteur général de l'apoptose, par la liaison et l'inhibition de nombreuses protéines (Lanneau *et al.*, 2007). Par exemple, lors d'un stress thermique ou osmotique, HSP70 est capable d'inhiber l'activation de la voie JNK, de la voie mitochondriale et des caspases 3 et 9 qui lui sont associées (Gabai *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005; Stankiewicz *et al.*, 2005). De plus, HSP70 inhibe l'apoptose de cellules lymphoïdes induite par des agents chimiothérapeutiques en inhibant l'activation de la mitochondrie par une liaison directe avec Bax (Guo *et al.*, 2005). Au niveau post-mitochondrial, HSP70 a été montrée capable de se lier à Apaf-1 et d'inhiber le recrutement de la caspase-9 et la formation de l'apoptosome (Beere *et al.*, 2000). Au niveau du noyau, HSP70 est capable de se lier au facteur AIF (*Apoptosis-inducing factor*), d'inhiber sa

translocation nucléaire et la condensation de la chromatine (Ravagnan *et al.*, 2001; Schmitt *et al.*, 2003). HSP70 a également été montrée capable de réguler l'activité des DNases activées par les caspases lors du processus apoptotique (Sakahira et Nagata, 2002). L'altération de la fonction d'HSP70 par la surexpression d'un mutant d'AIF cytoplasmique et constitutivement lié à HSP70 augmente la sensibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose mitochondriale induite par divers stimuli (Schmitt *et al.*, 2003).

Récemment, une série d'aptamères dirigés contre HSP70 a été développée. Ce sont des oligonucléotides qui ont la capacité de se fixer sur HSP70 dans le but d'inhiber son activité. Certains aptamères sensibilisent efficacement des cellules cancéreuses à divers agents chimiothérapeutiques *in vitro* et *in vivo*, ce qui confirme l'intérêt de l'inhibition d'HSP70 dans un but thérapeutique (Rerole *et al.*, 2011).

HSP70 dans l'apoptose induite par TRAIL

L'intérêt de l'altération d'HSP70 pour sensibiliser efficacement des lignées cancéreuses du poumon et du pancréas à l'apoptose induite par TRAIL a été montré dans plusieurs études (Zhuang *et al.*, 2013; Monma *et al.*, 2013). Cela est expliqué notamment par la surexpression des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 et la dérégulation de FLIP_L en l'absence d'HSP70 (Zhuang *et al.*, 2013). Une autre étude a montré une interaction directe entre HSP70 et les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2, inhibant ainsi le recrutement et l'activation de la caspase-8 au sein du DISC TRAIL (Guo *et al.*, 2005). Cependant, de par les propriétés chaperon d'HSP70, celle-ci a la réputation de se lier facilement de manière non-spécifique. L'immunoprécipitation démontrant l'interaction ayant été faite suite à la surexpression d'HSP70 et sans contrôle d'immunoprécipitation, un doute subsiste quant à la spécificité de cette interaction.

Fonctions anti-stress

HSP70 replie les protéines mal conformées, leur rendant leur structure et leur fonction initiale. Cela peut se faire en étroite collaboration avec d'autres HSP notamment HSP40 ou HSP110 avec lesquels HSP70 interagit via un motif "EEVD" en C-ter (Shorter, 2011; Mattoo *et al.*, 2013). HSP70 est très inductible (Che *et al.*, 2007) et protège les cellules d'un stress thermique par la prévention de la formation d'agrégats protéiques toxiques (Welch et Suhan, 1986; Nollen *et al.*, 1999; Barnes *et al.*, 2001).

Un point intéressant à préciser à propos d'HSP70 est son rôle dans l'immunité. Cette protéine est exprimée à la membrane des cellules cancéreuses ce qui stimule la réponse immunitaire innée et adaptative notamment en favorisant la reconnaissance d'antigènes tumoraux (Milani *et al.*, 2002; Kleinjung *et al.*, 2003; Stangl *et al.*, 2011; Jolesch *et al.*, 2012).

4. La famille d'HSP90

HSP90 est une famille de chaperon très largement exprimée dans les cellules. Son principal membre HSP90 pourrait représenter environ 1 à 2% de la totalité des protéines cellulaires (Csermely *et al.*, 1998). Cette famille est composée de cinq membres dont trois sont cytosoliques, comme c'est le cas d'HSP90 α et β , un membre est mitochondrial (TRAP1/HSP90L/HSPC5) et un membre est localisé dans le réticulum endoplasmique (GRP94/HSP90B1/HSPC4). Les mieux décrits sont les isoformes α et β d'HSP90. Les protéines de la famille d'HSP90 ont une activité chaperon dépendante de l'ATP et elles sont inductibles à l'exception d'HSP90 β qui est exprimée de manière constitutive. Cette partie a pour objectif de détailler la structure et les fonctions des isoformes d'HSP90.

A. Structure d'HSP90

Les protéines de la famille d'HSP90 agissent sous la forme d'homodimères. Trois domaines principaux sont décrits : le domaine N-ter comprend le site de fixation de l'ATP ; le domaine central est impliqué dans la reconnaissance des protéines clientes ; le domaine C-ter est responsable de leur dimérisation (figure 16) (Johnson, 2012). Sous sa forme dimérique HSP90 est capable de fixer une protéine mal repliée, puis l'ouvre et la replie correctement suite à l'hydrolyse d'ATP, ce qui peut prendre plusieurs cycles (Pearl *et al.*, 2006; Saibil *et al.*, 2014).

HSP90 est exprimée sous trois isoformes, HSP90 α 1 ((HSP90AA1/HSP86/HSPC1), HSP90 α 2 (HSP90AA2/HSPC2) et HSP90 β (HSP90AB1/HSP84/HSPC3) qui proviennent de deux duplications successives d'un gène ancestral et présentent au moins 86% d'homologie entre eux. Les isoformes d'HSP90 sont exprimées dans le cytoplasme sans que des différences fonctionnelles majeures aient été mises en évidence pour l'instant (Sreedhar *et al.*, 2004).

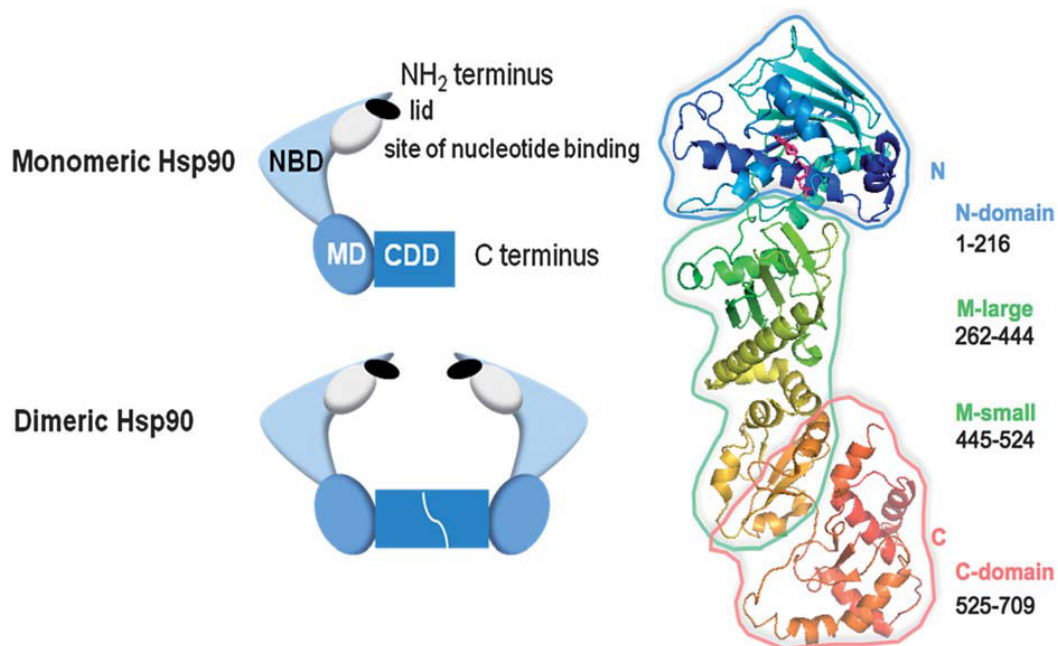


Figure 16. Structure d'HSP90

Schéma représentatif d'HSP90. HSP90 est constituée d'un domaine de liaison à l'ATP en N-ter (*nucleotide binding domain* - NBD), un domaine qui reconnaît les protéines clientes (*middle domain* - MD) et un domaine responsable de sa dimérisation (*C-terminal dimerisation domain* - CDD). (adapté de Franke *et al.*, 2013)

B. Stress et fonctions anti-apoptotiques

Fonctions cellulaires

Leur rôle est notamment d'aider au repliement de protéines nouvellement synthétisées et ce en association avec les ribosomes (Kim *et al.*, 2006; Taipale *et al.*, 2010; Theodoraki *et al.*, 2012). HSP90 impacte le comportement des cellules via l'intermédiaire de ses protéines clientes, elle en possède plus de deux cents (McClellan *et al.*, 2007; Lanneau *et al.*, 2007). Nombre de ces protéines sont des facteurs importants en cancérologie, impliquées dans des processus comme la prolifération, la différenciation ou l'apoptose (Jego *et al.*, 2012). Parmi ses clients, on retrouve par exemple la protéine anti-apoptotique Bcl-2, la protéine pro-apoptotique Apaf-1 ou la kinase RIP1 (Dias *et al.*, 2002; Palacios *et al.*, 2010; Gallerne *et al.*, 2013).

Fonctions anti-apoptotiques

Les rôles protecteurs d'HSP90 sur les cellules cancéreuses en ont fait une cible de choix dans la thérapie contre le cancer (Miyata *et al.*, 2013; Centenera *et al.*, 2013; Barrott

et Haystead, 2013). De nombreux inhibiteurs prenant pour cible la poche enzymatique du domaine de fixation de l'ATP ont été développés au cours des années passées (Jhaveri et Modi, 2012). Ils ont pour effet la déplétion des protéines clientes d'HSP90, perturbant ainsi de nombreuses voies de signalisation (Kamal *et al.*, 2003; Tillotson *et al.*, 2010). Parmi eux, on trouve la geldanamycine et certains de ses dérivés comme le 17-DMAG ou le 17-AAG qui est actuellement en phases II/III d'essais cliniques (Modi *et al.*, 2011; Pacey *et al.*, 2012; Hendrickson *et al.*, 2012).

Les inhibiteurs d'HSP90 ont été testés en combinaison avec de nombreuses thérapies dont TRAIL et ses dérivés (Lu *et al.*, 2012). Aucune étude clinique ou préclinique n'a été faite sur cette combinaison pour l'instant, cependant plusieurs études ont montré son intérêt sur diverses lignées cancéreuses : des carcinomes de la prostate (Ma *et al.*, 2006), des carcinomes ovariens (Kim *et al.*, 2012a), des glioblastomes (Siegelin *et al.*, 2009), divers cancers du poumon (Wang *et al.*, 2006b), ou du colon (Vasilevskaya et O'Dwyer, 2005; Saturno *et al.*, 2013). Les études sont unanimes sur les mécanismes de sensibilisation impliqués et décrivent une inhibition des voies de survie d'Akt et de NF- κ B suite à l'inhibition d'HSP90 (Vasilevskaya et O'Dwyer, 2005; Wang *et al.*, 2006b; Ma *et al.*, 2006; Saturno *et al.*, 2013).

Par ailleurs, une étude a montré que le blocage d'HSP90 conduit à la déplétion de RIP1 ainsi que dans certains modèles la surexpression de FLIP (Palacios *et al.*, 2010). Les propriétés d'HSP90 seraient également déterminantes pour le rôle inhibiteur de FLIP dans un modèle de gliome. En effet, outre son rôle de chaperon lors de la synthèse de protéines, HSP90 se lie aux isoformes FLIP_S et FLIP_L et permet leur recrutement ainsi que son propre recrutement au niveau du DISC de TRAIL (Panner *et al.*, 2007).

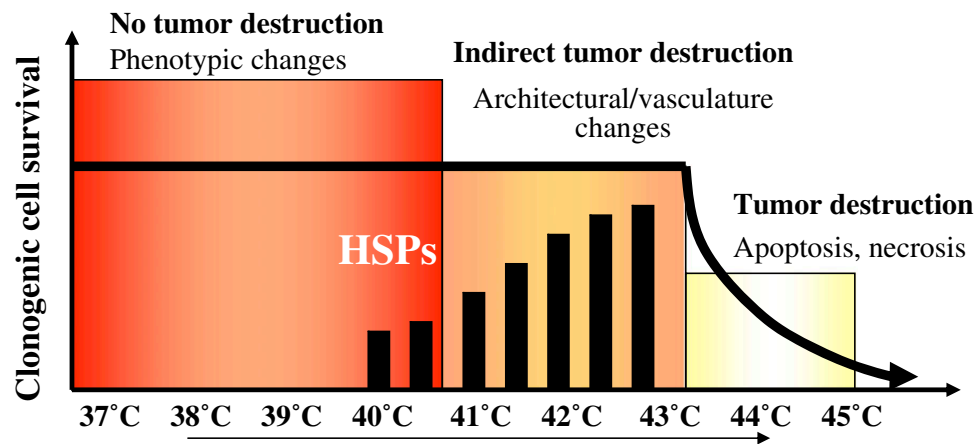
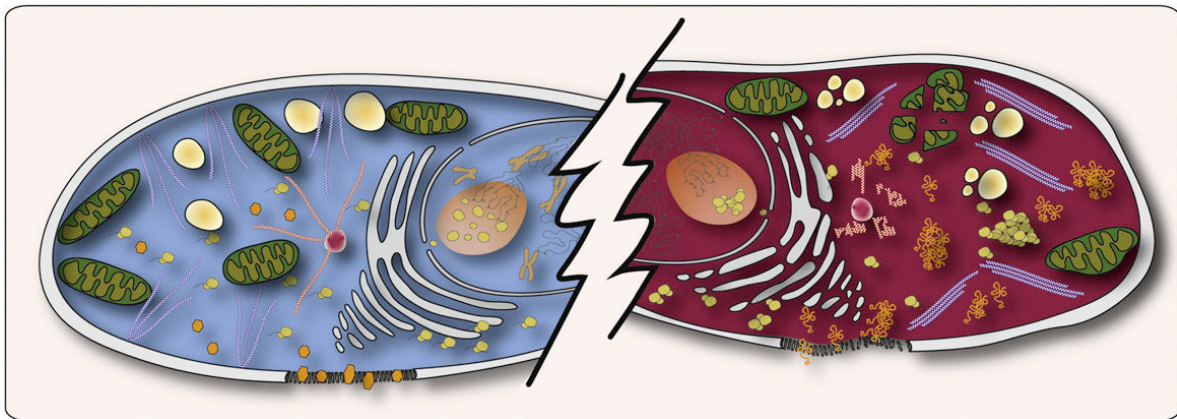
A**B**

Figure 17. Réponse des tumeurs à l'hyperthermie

A. Schéma représentatif de la réponse d'une tumeur à l'hyperthermie. Une induction des HSP est observée à partir d'une température d'environ 40°C. 43°C est une température charnière entre une destruction indirecte (sensibilisation) et une destruction directe de la tumeur par la chaleur via des mécanismes d'apoptose et de nécrose. (adapté de Issels, 2008)

B. Comparaison schématique d'une cellule normale (à gauche et en bleue) et d'une cellule stressée suite à un choc thermique (à droite et en rouge). Le choc thermique affecte le cytosquelette avec une réorganisation des filaments d'actine (en bleu), une déstructuration et l'agrégation des microtubules (en rose). Les organites tels que le réticulum endoplasmique, les mitochondries et les lysosomes sont fragmentés et/ou voient leur nombre diminuer. Des granules visibles en microscopie, constitués de protéines et d'ARN (en jaune) ainsi que des précipités protéiques (en orange) sont retrouvés dans le noyau et le cytoplasme. Enfin la fluidité et la perméabilité des membranes est affectée. (adapté Richter *et al.*, 2010)

III. L'hyperthermie

Une hyperthermie, également appelée choc ou stress thermique, est une augmentation locale ou générale de la température corporelle pouvant aller d'environ 39°C jusqu'à environ 47°C dans le cas d'une destruction ciblée d'une tumeur (figure 17A). Les effets cellulaires et moléculaires de l'hyperthermie sont nombreux et variés. L'hyperthermie affecte le statut, l'organisation et la synthèse de nombreuses protéines et agit sur la survie, la division et la migration des cellules (figure 17B) (Richter *et al.*, 2010). L'hyperthermie est déjà utilisée et étudiée comme adjuvant à la radiothérapie et à certaines chimiothérapies mais les mécanismes de sensibilisation sont partiellement définis. Cette partie a pour objectif de décrire les effets de l'hyperthermie sur les cellules cancéreuses, ses applications et ses interactions avec la voie apoptotique induite par TRAIL.

1. Les effets cellulaires d'un choc thermique

A. Les effets d'un choc thermique sur l'agrégation protéique

L'agrégation protéique est le processus le plus délétère des effets cytotoxiques de l'hyperthermie. Celle-ci fait suite à une dénaturation des protéines qui dépend beaucoup de la conformation et de la stabilité énergétique des protéines en question. Le seuil nécessaire pour provoquer un effet cytotoxique serait de 5% de protéines cellulaires agrégées (Lepock *et al.*, 2003)

a) *Structure, conformation et repliement des protéines*

Généralités sur la structure des protéines

Les protéines sont caractérisées par leur séquence d'acides aminés et leur conformation tridimensionnelle qui déterminent la position dans l'espace des différents atomes qui la composent ainsi que leur flexibilité les uns par rapport aux autres. La grande

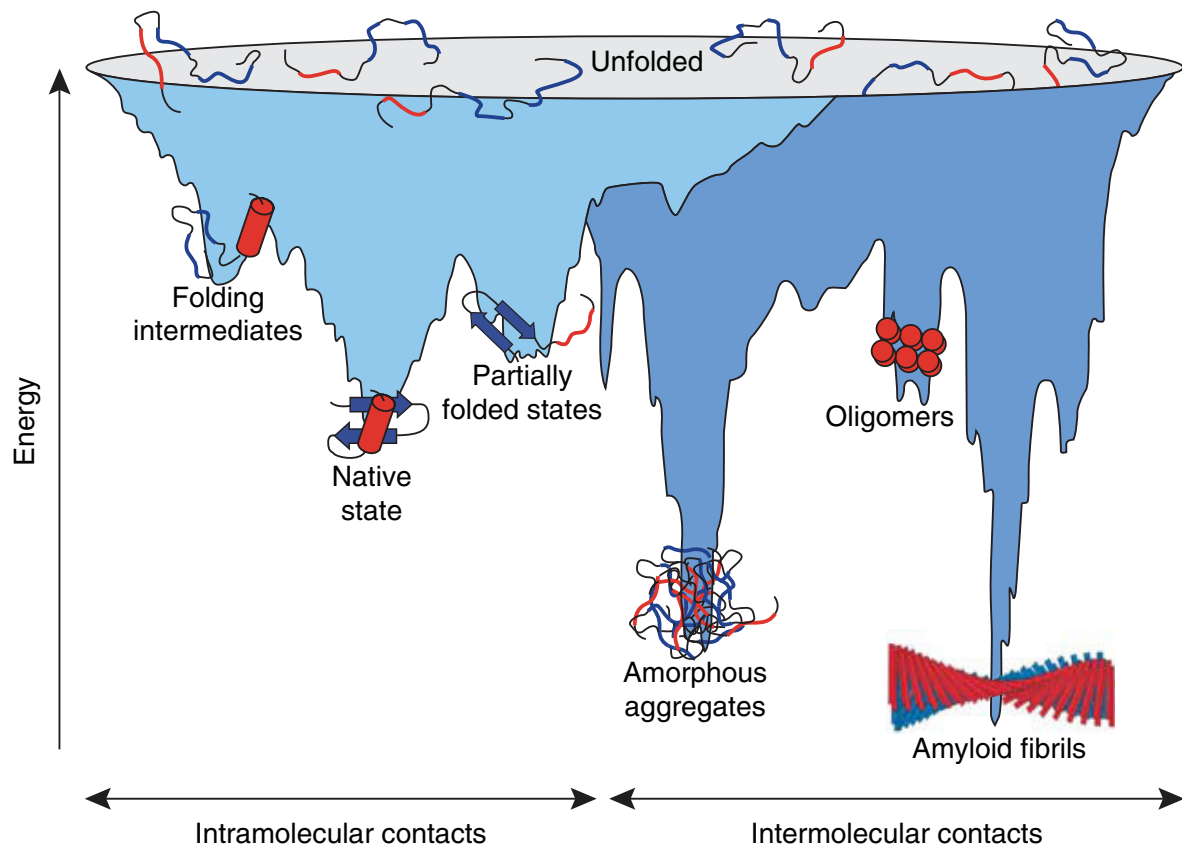


Figure 18. Statut énergétique des protéines suivant leur conformations et leur agrégation

La zone en bleu clair représente les différents stades et niveaux énergétiques d'une protéine dans ses conformations physiologiques sans contact intermoléculaire. La zone en bleu foncé représente les différents stades et niveaux énergétiques d'une protéine dans des structures oligomérisées ou agrégées où le contact intermoléculaire est présent. Plus l'énergie est faible, plus la protéine est dans une configuration stable. Ainsi, les protéines non repliées (*unfolded*) sont les plus instables et les fibrilles amyloïdes (*amyloid fibrils*) sont les plus stables. Les formes natives, oligomérisées ou partiellement repliées ont un niveau d'énergie intermédiaire.

majorité des protéines, indépendamment de leur type (enzyme, récepteur, protéine de structure etc.), nécessitent une conformation correcte et unique, dite “native”, pour remplir pleinement sa fonction biologique (Hartl et Hayer-Hartl, 2009).

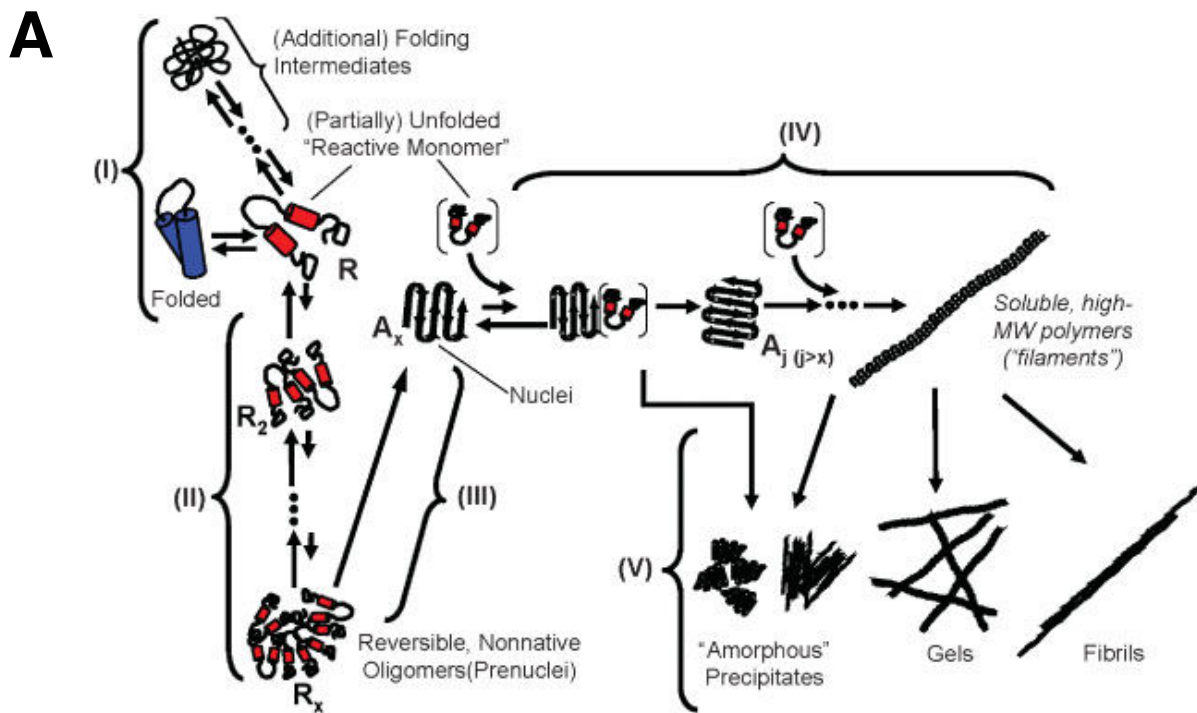
Les protéines ont plusieurs niveaux d'organisation : la structure primaire (séquence peptidique) maintenue par des liaisons covalentes ; la structure secondaire (hélices, feuillets et coudes) maintenue par des liaisons hydrogènes ; les structures tertiaires et quaternaires (domaines, polymères) conférant une éventuelle activité et dépendantes des liaisons à la fois faibles et fortes. Autrement dit, l'organisation tridimensionnelle des protéines, résultant de leur structure secondaire, tertiaire et quaternaire, dépend de liaisons faibles qui sont sensibles notamment à la température (Seckler et Jaenicke, 1992). Leur configuration native et fonctionnelle est thermodynamiquement stable et typiquement composée d'un coeur d'acides aminés hydrophobes et d'acides aminés hydrophiles en surface (figure 18) (Levy et Onuchic 2006).

Le repliement des protéines

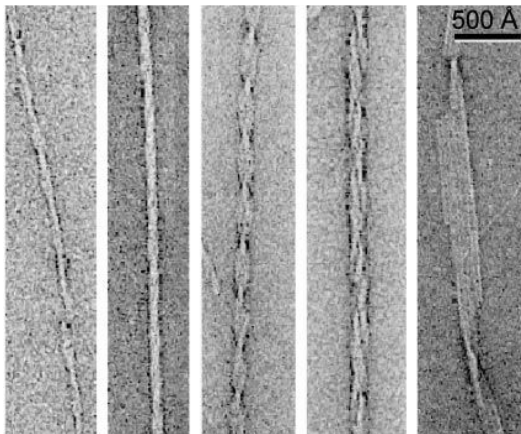
Les premières études sur le repliement des protéines montrèrent que celui-ci peut se faire spontanément en fonction de la séquence peptidique (Anfinsen, 1973). Cependant, à partir d'une certaine taille (>100 acides-amino) et les contraintes présentes dans le milieu intracellulaire comme la concentration en protéines (300 à 400 mg/mL), le repliement correct de certaines protéines devient impossible sans une intervention extérieure (Zimmerman et Trach, 1991, Brockwell et Radford, 2007). Ainsi, une partie importante des protéines nouvellement synthétisées nécessitent l'aide de protéines dites “chaperon” pour leur bon repliement. Beaucoup de ces chaperon moléculaires appartiennent à la famille des HSP (Hartl, 1996).

Le repliement d'une protéine se fait au fur et à mesure de sa traduction, son échec peut conduire à la dénaturation de la protéine puis à sa dégradation par le protéasome ou à l'apparition d'agrégats protéiques toxiques (Hartl *et al.*, 2011). Un mauvais repliement peut être dû ou favorisé par un stress (thermique, oxydant, pH), une sur-expression, une mutation ou encore une modification post-traductionnelle (Lamark et Johansen, 2012).

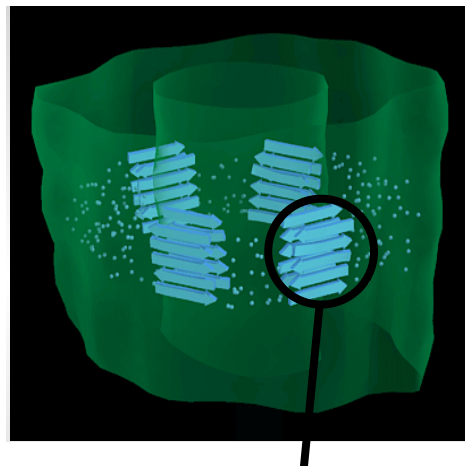
b) La dénaturation et la formation d'agrégats protéiques



B



C



Feuillets en cross bêta

Figure 19. Les étapes de la formation d'agrégats

A. Schéma représentatif des différentes étapes dans la formation d'agrégats selon le modèle de Roberts. L'agrégation se passe selon un processus en 5 étapes à savoir : la conversion de la conformation des protéines en monomères réactifs (I) ; l'oligomérisation de ces monomères réactifs en un oligomère réversible (II) ; la nucléation ou la formation d'un oligomère non réversible (III) ; la formation de protofibrilles ou l'élongation (IV) ; la condensation des protofibrilles en précipités amorphes, en gels ou en fibrilles (V). (adapté de Roberts, 2007)

B. Photos de fibrilles en microscopie électronique.

C. Schéma représentatif d'une coupe transversale de fibrille. Les chaînes protéiques interagissent en feuillets cross-bêta et forment des fibres en s'agrégeant les unes aux autres dans le sens de la longueur.

La formation d'agrégats est un processus complexe qui passe par la perte des structures secondaires et/ou tertiaires natives, ce qui mène à un enchevêtrement de protéines pouvant prendre la forme d'agrégats informes ou de fibrilles très organisées (figure 18). On parle également d'oligomère organisé ou non-organisé. Par ailleurs, on distingue l'agrégation voulue, comme celle des fibres d'actine ou de tubuline, de l'agrégation non voulue notamment responsable des dégénérescences neuronales observées dans les maladies de Parkinson et d'Alzheimer ou de la toxicité d'un choc thermique (Jucker et Walker, 2013).

L'agrégation non voulue commence lorsque deux protéines se fixent l'une à l'autre dans une conformation non native, de manière non-spécifique et incontrôlée (Jahn et Radford, 2008; Eichner et Radford, 2011). Les mécanismes de l'agrégation restent partiellement connus du fait du caractère très éphémère de certains stades initiaux. Ainsi, plusieurs modèles ont été développés dont le modèle de Roberts, constitué de cinq étapes distinctes : la conversion de la conformation des protéines ; l'oligomérisation ; la nucléation ; la formation de protofibrilles ; la condensation (figure 19A) (Andrews et Roberts, 2007; Roberts, 2007).

Etape 1 : la conversion de la conformation

Les protéines ayant une conformation altérée ou étant partiellement repliées sont les précurseurs d'agrégats de haut poids moléculaire, on parle alors de monomère réactif (Khurana *et al.*, 2001; Goers *et al.*, 2002). L'équilibre entre les formes natives et altérées dépend des paramètres qui affectent la barrière énergétique entre les formes. Ces paramètres précédemment évoqués sont : la stabilité énergétique basale des protéines en question; leur concentration ; les paramètres environnementaux (température, composition chimique du milieu etc.). Ainsi, certaines protéines ont une facilité intrinsèque à s'agréger, ce qui peut être favorisé par divers paramètres environnementaux et être à l'origine de certains phénomènes et maladies (Singleton *et al.*, 2003; Uversky, 2007).

Etape 2 : La formation d'oligomères réversibles

L'association de deux ou plusieurs monomères réactifs mènent à la formation d'un oligomère dit "non-natif" par opposition à la forme native des protéines. A ce stade la

conformation des protéines est réversible, notamment à l'aide de protéines chaperon (Mannini *et al.*, 2012).

Etape 3 : La nucléation

Au sein de cet oligomère réversible, le réarrangement des chaînes polypeptidiques en feuillet dits “cross-Beta” favorise un large contact entre les acides aminés de différentes protéines par des liaisons hydrogènes et hydrophobes, stabilisant ainsi la structure de l'oligomère. Ceci mène à la formation du noyau de l'agrégat (d'où la nucléation) qui est le premier oligomère très stable énergétiquement et dont la conformation est considérée comme non réversible (Wang *et al.*, 2005).

Etape 4 : La formation de protofibrilles

Cette étape consiste principalement en la croissance de l'agrégat par l'ajout d'un ou plusieurs monomères sous sa forme native, réactive ou agrégée de manière à constituer une chaîne organisée de protéines (protofibrilles). À cette étape, le recrutement de monomères est plus rapide qu'à l'étape de la nucléation (Lomakin *et al.*, 1997; Ferrone, 1999). L'observation de la croissance anisotrope des agrégats n'est pas encore pleinement comprise mais ce phénomène est attribué à la forte proportion de feuillets Beta dans les protofibrilles et à ses caractéristiques géométriques (Roberts, 2007).

Etape 5 : La condensation

Cette étape consiste en l'association d'agrégats. Les protofibrilles formées peuvent s'associer en trois structures différentes à savoir : des agrégats amorphes, des gels ou des fibrilles (figure 19B et C) chacune étant constituée de protofibrilles (Bhak *et al.*, 2009).

Plusieurs structures peuvent être obtenues à partir de l'agrégation d'une seule protéine, ce qui révèle l'existence de plusieurs voies d'agrégation possibles (Kodali et Wetzel, 2007; Bhak *et al.*, 2009). Les fibrilles nécessitent des conditions particulières pour être formées, ce qui n'est pas le cas des agrégats amorphes. La vitesse de formation des agrégats amorphes est également plus rapide (Uversky, 2010).

Les agrégats protéiques sont connus pour être toxiques pour les cellules (Shearman, 1999; Bucciantini *et al.*, 2002). Le mécanisme de toxicité passe par l'altération de certaines fonctions cellulaires vitales pour la cellule (Stefani et Dobson, 2003). En effet, les parties hydrophobes des protéines sont capables d'interagir avec d'autres composants cellulaires et de les endommager. Plusieurs études montrent la capacité des agrégats protéiques à s'associer aux membranes et à induire leur perméabilisation (Kakio *et al.*, 2004; Hirano *et al.*, 2012; Sasahara *et al.*, 2013). Les agrégats solubles et partiellement formés seraient les plus réactifs et les plus toxiques (Zhu *et al.*, 2000; Holmes *et al.*, 2014). Par ailleurs, le glycérol est connu pour compacter la conformation des protéines, stabiliser les chaînes hydrophobes de protéines dénaturées et ainsi d'inhiber la formation d'agrégats protéiques (Edington *et al.*, 1989; Dubois *et al.*, 1991; Vagenende *et al.*, 2009).

c) L'agrésome

L'agrésome a été décrit pour la première fois en 1998 dans le cadre de la recherche contre la Mucoviscidose. C'est une entité complexe localisée autour du noyau cellulaire et constituée de différents composants à savoir : des agrégats protéiques ; des protéines chaperon ; des constituants du cytosquelette (Johnston *et al.*, 1998). L'agrésome se forme suite au transport des protéines agrégées de la périphérie de la cellule vers une zone d'accumulation au centre des microtubules. Sa formation nécessite donc la fonctionnalité du système de transport intracellulaire (Garcia-Mata *et al.*, 1999). Une cage de vimentine se forme autour de l'agrésome, l'isolant du reste de la cellule (Johnston *et al.*, 1998). Les protéines agrégées sont généralement ubiquitinyllées et associées à des protéines chaperon dont l'alphaB crystallin, HSP40 et HSP70 (Ryan *et al.*, 2002; Jia *et al.*, 2014). HSP27 est également retrouvée dans l'agrésome de manière indépendante à son statut de phosphorylation et sa présence ralentit la formation de l'agrésome (Bolhuis et Richter-Landsberg, 2010). La protéine chaperon 14-3-3 est également retrouvée colocalisée avec les marqueurs de l'agrésome (Waelter *et al.*, 2001). Deux publications ont montré que certaines isoformes de 14-3-3 sont indispensables à la formation de l'agrésome (Omi *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2013). Les mécanismes décrits montrent que la protéine 14-3-3 fait l'intermédiaire entre HSP70, elle-même liée aux agrégats, la protéine cochaperon BAG3 et la dynéine dans le but de transporter les agrégats le long des microtubules (figure 20) (Gamerding *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2014). Par ailleurs, une étude a montré une interaction entre les protéines BAG3 et HSP22/HSPB8 ainsi que leur surexpression par l'activation de NF- κ B suite à un choc thermique. Les auteurs ont montré

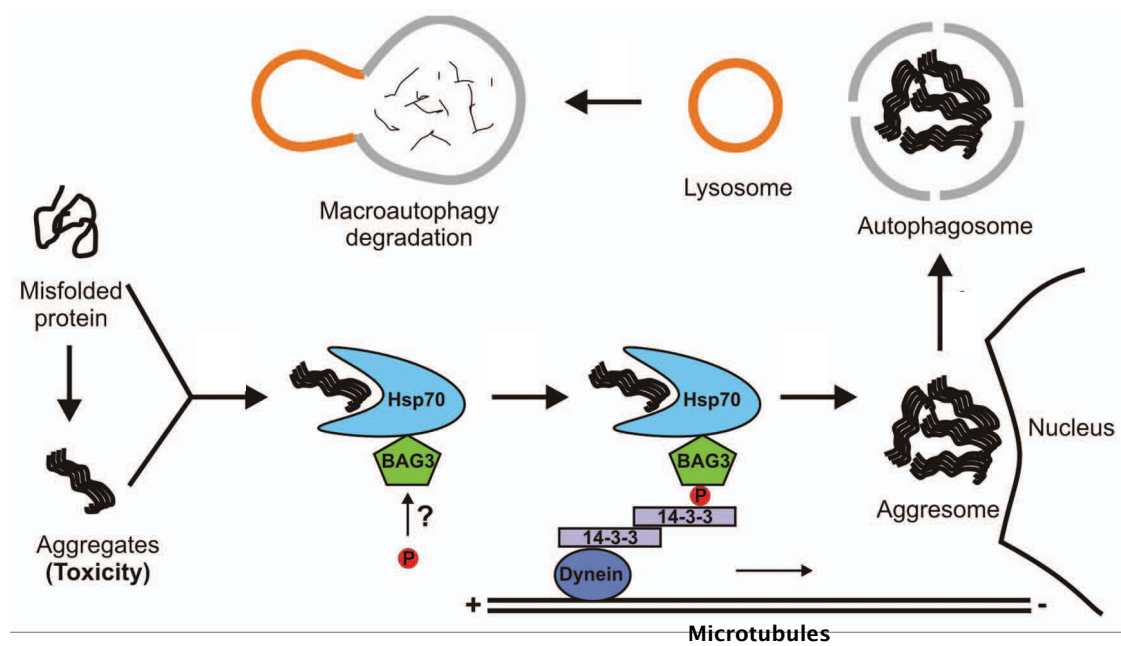


Figure 20. Les étapes de la formation et de l'élimination d'un agrésome

Représentation schématique du modèle de la formation d'un agrésome et de son élimination par macroautophagie. L'étape clé du transport implique un complexe de protéines chaperon et co-chaperon constitué d'HSP70, BAG3 et 14-3-3 pour faire l'intermédiaire entre les agrégats toxiques et les microtubules. L'agrésome formé peut ensuite être éliminé par un processus macroautophagique. (adapté de Jia *et al.*, 2014)

que ce mécanisme favorise la survie des cellules par l'élimination de l'agrésome par un processus autophagique particulier appelé agréphagie (Nivon *et al.*, 2012 ; Lamark et Johansen, 2012; Petroi *et al.*, 2012).

La formation d'un agrésome ou d'une agrégation protéique non-voulue, est très régulée par le système de dégradation ubiquitine/protéasome. En effet, les protéines qui forment des agrégats sont celles qui n'ont pas pu être dégradées par le protéasome. Ainsi, son blocage mène à la formation d'un agrésome dans une lignée humaine d'oligodendrocyte (Bolhuis et Richter-Landsberg, 2010). Cependant, même si des unités du protéasome sont retrouvées au sein de l'agrésome, il est considéré qu'elles sont en trop faible quantité (1% du total) pour réussir à dégrader l'ensemble des protéines agrégées à la fois et très insolubles (Fabunmi *et al.*, 2000).

B. Le système de contrôle et de dégradation protéique

a) *L'ubiquitination des protéines*

L'ubiquitine

L'ubiquitine est un polypeptide de 76 acides aminés pour 8,5 kDa très conservé chez les organismes eucaryotes. Il appartient à une famille nommée "*ubiquitin-like*" (UBL) comprenant plusieurs membres dont SUMO ou Nedd8 (Streich et Lima, 2014). L'ubiquitine est désormais considérée comme une protéine de choc thermique, elle est également surexprimée au cours d'un stress cellulaire (Bond et Schlesinger, 1985).

L'ubiquitine peut être codée par plusieurs gènes différents, elle est produite sous la forme d'un dimère et nécessite un clivage spécifique pour être fonctionnelle (Wiborg *et al.*, 1985; Liu *et al.*, 1989).

Mécanisme d'ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle réversible consistant en l'ajout d'une ubiquitine par l'intermédiaire d'une liaison covalente (Papa et Hochstrasser, 1993; Herskho et Ciechanover, 1998). La liaison se fait généralement sur le groupe amine d'une lysine, mais celle-ci a été exceptionnellement observée sur d'autres résidus d'acides aminés (Cadwell et Coscoy, 2005; Wang *et al.*, 2007; Mattioli et Sixma, 2014).

L'ubiquitination est impliquée dans divers processus comme la division, la différenciation, le transport et la dégradation des protéines (Mukhopadhyay et Riezman, 2007). Celle-ci se déroule en trois étapes et fait appel à 3 types d'enzymes : les enzymes E1, E2 et E3 (Hershko *et al.*, 1983). Il n'existe qu'une seule enzyme E1 (*Ubiquitin-activating enzyme - Uba1*), qui a pour action d'activer l'ubiquitine avec la formation d'une liaison thioesther par un processus ATP dépendant. L'ubiquitine est ensuite transférée sur une enzyme E2 (*Ubiquitin-conjugating enzyme*) via une réaction de transestérification, 36 E2 ont été décrites chez l'homme. Puis, l'ubiquitine est transférée sur la protéine cible par l'intermédiaire d'une protéine E3 (*Ubiquitin-protein ligase*) par la création d'une liaison isopeptidique entre la glycine C-ter de l'ubiquitine et le groupe NH₂ d'un résidu lysine. Il en existe plus de 700 chez l'homme (Hershko *et al.*, 1983; Metzger *et al.*, 2014).

Les signaux de l'ubiquitine

L'ubiquitine possède plusieurs résidus lysine (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) qui ont chacun la capacité d'être ubiquitylé. Ainsi, l'ubiquitination peut prendre la forme de mono-, de multi- (dans le cas de plusieurs monoubiquitination) ou de polyubiquitination en chaîne (Xu *et al.*, 2009). Cela génère une grande diversité pour la reconnaissance spatiale et permet des interactions avec de nombreuses protéines différentes (Raasi *et al.*, 2005; Hicke *et al.*, 2005).

L'effet de l'ubiquitination sur la protéine cible dépend ainsi du type d'ubiquitination subi (Xu et Jaffrey, 2013). Par exemple, la mono- et la multiubiquitination peuvent altérer certaines interactions protéine-protéine (Mukhopadhyay et Riezman, 2007). Le premier rôle ayant été décrit pour l'ubiquitination, et le plus important, est l'adressage au protéasome en vue d'une dégradation (Hershko *et al.*, 1983). Celle-ci est provoquée par la reconnaissance d'une polyubiquitination en K48 (Wilkinson *et al.*, 1995) mais cela a également été observé avec une polyubiquitination en K11 (Jin *et al.*, 2008). Par ailleurs, la polyubiquitination en K63 est impliquée par exemple dans l'activation de la signalisation du facteur de transcription NF- κ B et dans des signalisations non dégradatives (Deng *et al.*, 2000; Kanayama *et al.*, 2004).

b) Dégradation protéasomale

Le protéasome est un complexe multienzymatique de haut poids moléculaire auquel sont transférées des protéines polyubiquitinylées en K48 en vue de leur protéolyse (Hase *et al.*, 1980; Arrigo *et al.*, 1988b).

Structure du protéasome

Le protéasome est constitué de deux sous-unités régulatrices, le protéasome 19S, de chaque côté d'une sous-unité catalytique, le protéasome 20S (Adams, 2003). Les sous-unités 19S reconnaissent les chaînes d'ubiquitine et les clivent de la protéine substrat, puis celle-ci est dénaturée et progresse vers le coeur catalytique (Zwickl *et al.*, 1999). Le protéasome 20S a une structure en cylindre et est constitué de 4 anneaux heptamériques identiques deux à deux (Coux *et al.*, 1996; Unno *et al.*, 2002b). Les anneaux internes possèdent 3 sites catalytiques chacun (Groll *et al.*, 1997) qui diffèrent dans leur activité et leur spécificité qui est de type : "*caspase-like*", "*trypsin-like*" ou "*chymotrypsin-like*" (Orlowski *et al.*, 1991; Cardozo *et al.*, 1995; Orlowski *et al.*, 1997). Les protéines sont ainsi découpées en polypeptides de 3 à environ 25 acides aminés (Nussbaum *et al.*, 1998). L'activité du protéasome peut être inhibée par des composés chimiques comme le MG-132 ou le bortézomib, ce dernier étant utilisé comme anticancéreux (Adams *et al.*, 1998; Byrn *et al.*, 2011).

Le fait, que les agrégats protéiques soient majoritairement insolubles et formés de manière irréversible, fait qu'ils ne sont pas dégradables par le protéasome (Roberts, 2007). En ce sens, la formation d'agrégats protéiques peut également bloquer toute l'activité protéasomale au sein des cellules (Seki *et al.*, 2007). Cela a notamment été observé par la formation d'agrégats de FLIP suite à sa surexpression dans une lignée cancéreuse de poumon (Ishioka *et al.*, 2007).

C. Les modifications structurales

a) *La fluidité membranaire*

Les membranes biologiques sont constituées à la fois de lipides et de protéines maintenues par des interactions faibles. Cela donne à l'ensemble une structure souple et permet à tous les éléments de se mouvoir au sein de la membrane. Cette mobilité, appelée fluidité membranaire, est probablement la caractéristique physico-chimique la

plus importante des membranes biologiques (Baritaki *et al.*, 2007). Son altération peut gravement affecter ses fonctions et les nombreuses voies de signalisation cellulaire qui en découlent (Kinnunen, 1991; Los et Murata, 2000). Dans des conditions normales, la fluidité membranaire dépend essentiellement de la composition lipidique de la membrane dont la saturation des acides gras ou la quantité de cholestérol présente (Stubbs et Smith, 1984). Par ailleurs, la fluidité membranaire et le métabolisme des lipides des cellules cancéreuses sont souvent modifiés, ce qui joue un rôle important dans leur résistance à l'apoptose (Hendrich et Michalak, 2003).

Plusieurs études ont montré que l'augmentation de la température fluidifie les membranes (Los et Murata, 2004; Csoboz *et al.*, 2013). Ce phénomène s'explique au niveau atomique par la nature même des membranes. En effet, l'intégrité et la rigidité des membranes biologiques dépendent des interactions faibles notamment les liaisons de type van der Waals, hydrogènes et hydrophobes dont la force diminue avec la température. En résumé, la température diminue les interactions entre les composants des membranes, ce qui augmente la fluidité de la membrane et potentiellement les signalisations membranaires.

b) Le cytosquelette

L'hyperthermie affecte rapidement l'architecture même des cellules par l'intermédiaire du cytosquelette. Celui-ci est essentiel à la prolifération, l'adhésion, le transport ou la mobilité cellulaire (Pollard, 2003). Au niveau moléculaire, l'hyperthermie induit entre autres la dépolymérisation des filaments d'actine et de tubuline (Huang *et al.*, 1999), la destruction des centrosomes et une désorganisation des microtubules et des microfilaments (Nakahata *et al.*, 2002). Il a été observé que le cytosquelette met environ 24h à se remettre en place suite à un choc thermique de 2h à 43°C (Nakahata *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter que la désorganisation du cytosquelette et la perte d'adhérence sont deux moyens de favoriser l'apoptose induite par TRAIL, par une stimulation de la voie apoptotique mitochondriale (Gasparian *et al.*, 2008; Gallegos et Brugge, 2014).

c) Au niveau nucléaire

La microscopie électronique a permis très tôt d'observer des changements morphologiques nucléaires de type granulaire et fibreux à la suite d'un traitement

thermique (Heine *et al.*, 1971). Ces changements sont notamment attribués à la caractéristique thermolabile de la matrice nucléaire dont les protéines subissent une dénaturation et une agrégation (Lepock *et al.*, 2001). A cela sont associées l'activation et la migration des protéines de choc thermique HSP70 et HSP27 dans le noyau dans le but de protéger la matrice (Roti Roti *et al.*, 1998; Coss *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2012). L'hyperthermie induit également des dommages à l'ADN et perturbe ses mécanismes de réparation ce qui a pour effet d'activer la voie mitochondriale (El-Awady *et al.*, 2001; Norbury et Zhivotovsky, 2004; Speit et Schutz, 2013).

D. La réponse cellulaire au stress thermique - induction de signalisations cellulaires

Un stress thermique peut induire différents processus comme la différenciation, la migration, un arrêt du cycle cellulaire ou encore la mort (Park *et al.*, 2005). Ces processus passent par l'induction de différentes voies de signalisation, dont des kinases, qui s'activent entre elles et deviennent les intermédiaires de la réponse aux stress. Les voies induites dépendent de l'intensité du stress subi et diffèrent selon les modèles (Park *et al.*, 2005).

Les protéines Ras et Rac-1, principaux constituants des petites GTPases de la voie Ras, sont activées au cours d'un choc thermique dans des fibroblastes humains (figure 21) (Han *et al.*, 2002). Ces protéines sont impliquées dans la morphologie, la mobilité, la division cellulaire et l'induction des HSP via l'activation du facteur de transcription HSF-1 (Han *et al.*, 2001; Stanhill *et al.*, 2006). Un stress thermique moyen induit également l'activation de la voie PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) et c-src (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*) qui sont, entre autres, des régulateurs importants de la survie, de la migration et de la division cellulaire (Lin *et al.*, 1997; Porta *et al.*, 2014). Lors d'un choc thermique, PI3K phosphoryle à son tour Akt qui est un facteur important de survie notamment par l'inhibition de Bax (Bang *et al.*, 2000; Yamaguchi et Wang, 2001).

Parmi les voies activées en cas de stress, la voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) tient un rôle particulier dans la balance entre la survie et la mort, notamment par l'induction et l'activation des protéines de choc thermique (Shaul et Seger, 2007; Sui *et al.*, 2014). Les MAPK ont pour caractéristique de s'activer en cascade, il existe 3 sous-familles : ERK, SAPK/JNK et p38 MAPK. La voie Erk est activée par un choc thermique

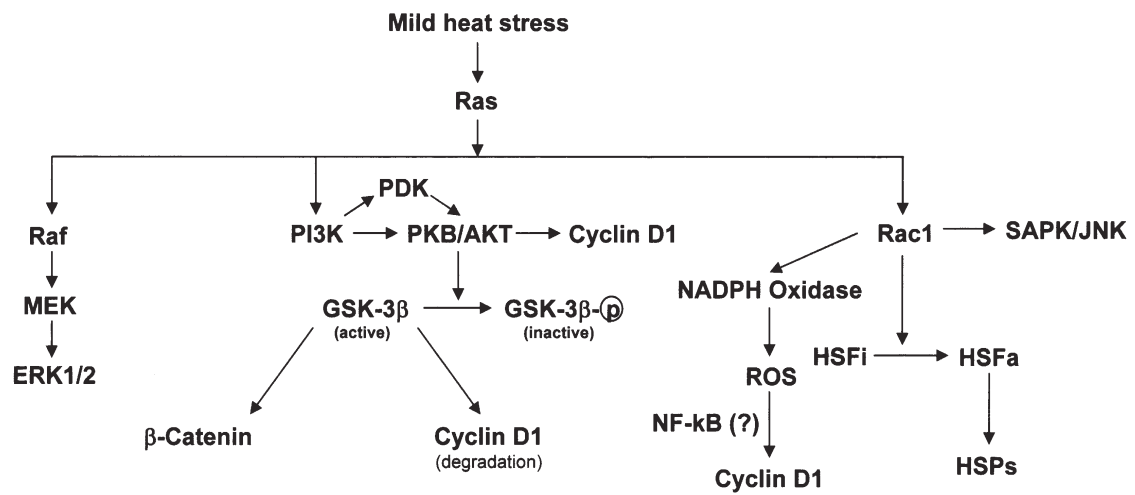


Figure 21. Signalisations induite suite à un choc thermique

Un choc thermique induit de nombreuses voies de signalisation dérivant directement ou indirectement de la signalisation EGFR/Ras. (adapté de Park *et al.*, 2005)

dans des fibroblastes humains, ce qui peut être bloqué par l'expression d'un dominant négatif de Raf kinase (membre de la cascade Ras/Raf/Mek/Erk) et partiellement bloqué par la wortmannin, un inhibiteur de PI3K (Lin *et al.*, 1997). L'activation de la voie JNK par un choc thermique est impliquée dans l'activation d'HSF-1 et la surexpression d'HSP70 (Park et Liu, 2001; Bironaite *et al.*, 2012). Il est intéressant de noter que JNK a été montré comme étant une cible de Rac-1 dans le cadre de la différenciation hématopoïétique (Kaminuma *et al.*, 2001). La voie p38 MAPK semble avoir pour cible principale la régulation des protéines HSP27 et son homologue l' α B-crystallin au cours d'un stress thermique. Elle induit la phosphorylation d'HSP27 et la dissociation de ses polymères, ce qui est déterminant dans sa capacité à protéger les cellules de la désorganisation des microfilaments d'actine au cours d'un stress thermique (Guay *et al.*, 1997; Kato *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2005). Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que la phosphorylation de la p38 MAPK peut être induite par la kinase RIP1, ce qui module l'apoptose induite par TRAIL (Azijli *et al.*, 2013).

Les nombreuses kinases activées au cours d'un choc thermique semblent avoir en commun le fait d'être activées directement ou indirectement par la voie Ras ou c-src (figure 21) (Kim *et al.*, 2013). Ainsi il est possible que des perturbations au niveau de la membrane plasmique provoquent l'induction d'une signalisation par la voie EGFR/Ras. En ce sens, une étude a montré qu'un inhibiteur du récepteur EGFR ainsi que l'expression d'un dominant négatif de l'EGFR inhibe l'activation des MAPK au cours d'un choc thermique (Lin *et al.*, 1997).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que les MAPK (Erk, JNK, p38) ainsi que Ras ont désormais des rôles clairement définis dans l'autophagie. Ces voies pourraient être liées à la survie des cellules suite à un stress par l'élimination d'un agrésome par agréphagie (Cagnol et Chambard, 2010; Bellot *et al.*, 2013; Sui *et al.* 2014).

2. L'hyperthermie contre le cancer

L'hyperthermie est un moyen déjà utilisé et très étudié pour augmenter le potentiel thérapeutique des traitements existants ou à l'étude. Cette partie a pour but d'exposer les combinaisons intéressantes avec l'hyperthermie, les mécanismes moléculaires impliqués et les méthodes d'induction de l'hyperthermie.

A. L'hyperthermie en combinaison avec TRAIL

Depuis le milieu des années 2000, il a été montré que l'hyperthermie permet la sensibilisation de cellules cancéreuses à TRAIL lorsque les traitements sont faits simultanément et non successivement. Les premières études ont démontré l'efficacité de cette combinaison sur des modèles de lignées de lymphomes (Moulin *et al.*, 2006) et de cancers colorectaux (Yoo *et al.*, 2006). L'innocuité sur les cellules saines de cette combinaison a été montré *in vitro* (Yoo *et al.*, 2006), sa faisabilité et son intérêt ont été montrés sur des xénogreffes de tumeurs colorectales chez la souris (Alcala *et al.*, 2010). La synergie est optimale lorsque le choc thermique est à une température d'environ 42-43°C. Une température inférieure n'a pas ou peu d'effets tandis qu'une température supérieure bloque la voie TRAIL (Yoo et Lee, 2007).

Les mécanismes de cette sensibilisation restent partiellement décrits mais plusieurs hypothèses ont été présentées. Le phénomène est rapide et indépendant de la transcription et de la traduction ce qui écarte l'implication potentielle de la surexpression d'HSP ou de constituants du DISC (Moulin et Arrigo, 2006). La caspase-2 pourrait avoir un rôle dispensable dans l'efficacité de cette combinaison tandis que l'activité des caspases 8 et 3 sont indispensables (Moulin et Arrigo, 2008).

Certaines études sur un modèle de carcinome colorectal présentent l'hypothèse selon laquelle l'hyperthermie permet l'activation de la mitochondrie et est associée à un relargage plus important du cytochrome c (Hermisson *et al.*, 2000; Yoo et Lee, 2008; Song *et al.*, 2012a; Song *et al.*, 2012b). Les mécanismes décrits impliquent l'activation de JNK lors d'un traitement TRAIL en hyperthermie, ce qui induit la phosphorylation inhibitrice de Bcl-xL et favorise l'activation de la mitochondrie (Alcala *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2012b; Song *et al.*, 2013b).

Également, deux études ont montré que l'hyperthermie induit l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de FLIP_L et FLIP_S permettant une meilleure activation de la caspase-8 et par conséquent, de la mitochondrie (Meinander *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2013a).

Par ailleurs, une étude a présenté l'hypothèse selon laquelle l'efficacité de la combinaison serait due à l'augmentation de la fluidité membranaire et montre sur des

lignées leucémiques que la synergie est abrogée par différents inhibiteurs de la voie de synthèse de la sphingomyéline (Moulin *et al.*, 2007b).

Pour résumer, la sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie semble être un phénomène complexe et multifactoriel interagissant à plusieurs niveaux avec la voie TRAIL, à savoir : au niveau membranaire; sur la présence de l'inhibiteur FLIP; au niveau de la voie mitochondriale.

B. L'hyperthermie en combinaison avec la radiothérapie

De nombreuses études, dont certaines études cliniques de phase III, montrent que l'hyperthermie permet d'augmenter l'efficacité des traitements radiothérapeutiques (Jones *et al.*, 2005; Franckena *et al.*, 2009; Hainfeld *et al.*, 2014) sans que cela puisse présenter de toxicité accrue pour les cellules saines (Varma *et al.*, 2012). Par exemple, une étude clinique de phase III a été faite sur des patients atteints de divers cancers superficiels traités en radiothérapie en combinaison ou non avec une hyperthermie locale (43°C, 90 minutes) induite par des radiofréquences (Jones *et al.*, 2005). Sur les 109 participants à l'étude une rémission complète a été observée dans 42,3% pour les patients traités par une radiothérapie seule, contre 66,1% chez les patients traités par une combinaison avec l'hyperthermie. Plus intéressant, il a été observé chez les patients ayant précédemment été traités et dont la radiorésistance des tumeurs s'est développée, une rémission complète dans 23,5% des cas avec une radiothérapie seule, contre 68,2% dans le cas d'une combinaison avec l'hyperthermie.

L'efficacité de cette combinaison n'est pas encore complètement expliquée. Cependant plusieurs études convergent sur la capacité de l'hyperthermie à provoquer la dénaturation et l'agrégation des protéines nucléaires et l'inhibition des systèmes de réparation de l'ADN qui en découlent (Sakkers *et al.*, 1995; Lepock, 2004; Eppink *et al.*, 2012; Genet *et al.*, 2013).

C. L'hyperthermie en combinaison avec la chimiothérapie

L'hyperthermie est également prometteuse en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques (tableau 3) (Issels *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Dans son étude clinique de phase III, Issels et son équipe ont montré que sur 341 patients atteints de

Molécule chimiothérapeutique	Durée du traitement thermique (min)	Ratio d'augmentation de l'efficacité du traitement	
		41,5°C	43,5°C
Cisplatine	30	1,48	1,59
Cyclophosphamide	30	2,28	2,74
Ifosfamide	30	1,52	-
Ifosfamide	90	3,6	-
Melphalan	30	3,6	-
BCNU	30	2,27	2,71
Bléomycine	30	1,24	1,65
Mityomycine C	30	1,05	-
5-Fluorouracile	30	1	1
Doxorubicine	30	1	1

Tableau 3. Ratio de sensibilisation par la température de différents agents chimiothérapeutiques
Ratio de sensibilisation de tumeurs à divers agents chimiothérapeutiques par la température. Ces expériences ont été faites chez l'animal. (Donnée prises de Issels, 2008)

sarcome des tissus mous, le groupe bénéficiant du traitement EIA (etoposide, ifosfamide et doxorubicin) obtint un taux de réponse tumorale de 12,7% contre 28,8% pour le groupe bénéficiant du traitement EIA avec une hyperthermie locale de 42°C pendant 60 minutes (Issels *et al.*, 2010). Les auteurs précisent que l'hyperthermie a été induite par des radiofréquences et a occasionné des brûlures modérées et sévères dans 17,8% et 0,6% des cas.

Les mécanismes impliqués dans la chimio-sensibilisation par l'hyperthermie sont multiples. L'inhibition des systèmes de réparation de l'ADN joue également un rôle, en particulier dans l'utilisation d'agents alkylant (Eppink *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'hyperthermie seule déclenche et augmente la nécrose et l'apoptose des cellules cancéreuses (Yonezawa *et al.*, 1996; Baur *et al.*, 2003), ce qui peut se traduire par une inflammation des tissus et une meilleure irrigation de la tumeur (Sun *et al.*, 2010). Ainsi, une meilleure irrigation de la tumeur par un traitement thermique est associée à une meilleure délivrance du médicament et une diminution de l'hypoxie (Song *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2010), qui sont deux facteurs déterminants dans la réponse d'une tumeur à un traitement chimiothérapeutique (Jain, 2005).

Par ailleurs, l'hyperthermie module la réponse immunitaire anti-tumorale et active certaines cellules immunitaires dont les cellules dendritiques, les NK et les lymphocytes (Frey *et al.*, 2012). Cette modulation passe notamment par surexpression d'HSP70 extracellulaire qui participe à la présentation des antigènes stimulant l'activation des cellules dendritiques (Milani *et al.*, 2002; Jolesch *et al.*, 2012).

3. Les moyens techniques d'induire une hyperthermie

En plus de l'intérêt de l'hyperthermie en tant qu'adjuvant à la chimio- ou la radiothérapie, celle-ci est également étudiée comme une alternative ou un complément à la chirurgie, on parle alors de thermo-ablation (Pereira, 2007). Plusieurs procédés ont été élaborés pour induire l'augmentation de la température du corps à un niveau global, régional (membre, organe) ou local (tumeur) (van der Zee, 2002).

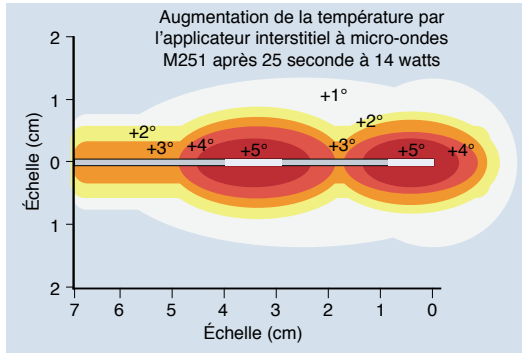
A**B****C****D**

Figure 22. Exemples d'induction d'une hyperthermie locale

A. Représentation schématique d'un applicateur interstitiel à micro-onde. (adapté de Chichel *et al.*, 2011)

B. Photo d'une patiente traitée d'un cancer du sein par une hyperthermie local induite par 5 émetteurs interstitiels à micro-ondes.

C. Photo du traitement d'un mélanome par une application superficielle de micro-onde avec le système BSD-500.

D. Extrait d'une brochure commerciale d'une machine à radiofréquences superficielles, le système BSD-2000.

L'induction d'une hyperthermie sur l'ensemble du corps peut se faire dans le cas de cancers métastatiques avancés par l'utilisation de chambres, de bains ou de radiateurs à infrarouges (Liapi et Geschwind, 2007).

L'induction d'une hyperthermie régionale peut se faire par une perfusion ou une infusion, ce qui peut permettre facilement un cotraitement avec un agent chimiothérapeutique (Thompson et Kam, 2008; Galen *et al.*, 2011).

Au niveau local, l'hyperthermie peut être induite de différentes manières (superficielle, interstitielle, intraluminale ou intracavitaire) par différents types d'ondes à savoir : les micro-ondes (figure 22A, B, C) ; les ultra-hautes fréquences (ou radiofréquences) (figure

22D); les ultrasons ; une lumière laser. Le type d'énergie utilisé et le type d'application dépend du volume et de la localisation de la zone à traiter (van der Zee, 2002), en effet, ces techniques peuvent présenter plusieurs inconvénients. Par exemple les ultrasons sont très absorbés par les os et sont réfléchis par les cavités qui contiennent de l'air. Également, les rayonnements électromagnétiques (micro-ondes ou radiofréquences) ont une perméabilité limitée dans le corps et peuvent s'avérer relativement imprécis (Cheung et Neyzari, 1984).

Pour pallier ces inconvénients et augmenter la spécificité de la localisation du traitement thermique, des techniques ont été récemment développées par l'utilisation de nanoparticules métalliques ou ioniques dégageant de la chaleur suite à des stimulations électromagnétiques (Hadjipanayis *et al.*, 2008, Banobre-Lopez *et al.*, 2013, Sato *et al.*, 2014). Également, certaines nanoparticules, comme les nano-coques ou les nano-tubes de carbone associées ou non à un métal (généralement de l'or), possèdent des propriétés qui leur permettent d'augmenter l'absorbance aux infrarouges et la spécificité du traitement thermique (Singh *et al.*, 2013; Vankayala *et al.*, 2014). Néanmoins, l'utilisation de nanoparticules n'est intéressante que si elles ont la capacité à se fixer spécifiquement aux cellules tumorales. Ainsi plusieurs anticorps couplés à des nanoparticules ont été développés. Certains sont dirigés contre des antigènes tumoraux tels que l'EGFR, dans le cadre du traitement de cancers de la vessie (El-Sayed *et al.*, 2006), le CD30 dans le cadre du traitement de lymphomes (Qu *et al.*, 2012) ou HER-2 dans le cadre du traitement de certains carcinomes squameux (Fekrazad *et al.*, 2011). Ces techniques sont pour l'instant à un stade expérimental ou préclinique et peuvent être limitées à l'avenir par une certaine pathogénicité des nano-particules de carbone, notamment par leurs effets carcinogènes liés à l'induction de dommages à l'ADN (Kumar et Dhawan, 2013).

Objectifs

Les essais cliniques sur TRAIL et ses dérivés ont montré que ces molécules peuvent être injectées en intraveineuse et bien tolérées par le corps humain. Néanmoins, leur efficacité étant réduite le plus souvent à un effet statique, elles ne peuvent pas être envisagées seulement en monothérapie. Le pouvoir anti-cancéreux de TRAIL semble limité par des mécanismes de résistance présents de manière récurrente au sein des cellules cancéreuses. L'avenir de TRAIL en thérapie repose donc sur la découverte de combinaisons capables de restaurer son efficacité sans pour autant que celles-ci soient toxiques pour les cellules saines.

Dans cette optique, ce projet a pour objectif d'évaluer dans un premier temps l'intérêt de l'hyperthermie en tant qu'adjuvant à un traitement par TRAIL. L'efficacité de cette combinaison sera mesurée *in vitro* sur différentes lignées cancéreuses connues pour être résistantes ou sensibles à l'apoptose induite par TRAIL.

Dans un deuxième temps, ce projet a pour objectif d'expliquer pourquoi cette combinaison est intéressante et quels sont les mécanismes contributeurs de cette sensibilisation à l'apoptose induite par TRAIL. L'hyperthermie est caractérisée par l'induction de très nombreux effets biologiques (activation de diverses voies de signalisation, surexpression des HSP, altération du cytosquelette) et physiques (fluidification des membranes, agrégation protéique), ce qui laisse de nombreuses hypothèses à explorer afin d'en expliquer les propriétés.

Ce projet a pour objectif secondaire d'identifier les critères déterminants un environnement favorable à l'efficacité de la combinaison de TRAIL et de l'hyperthermie.

Résultats

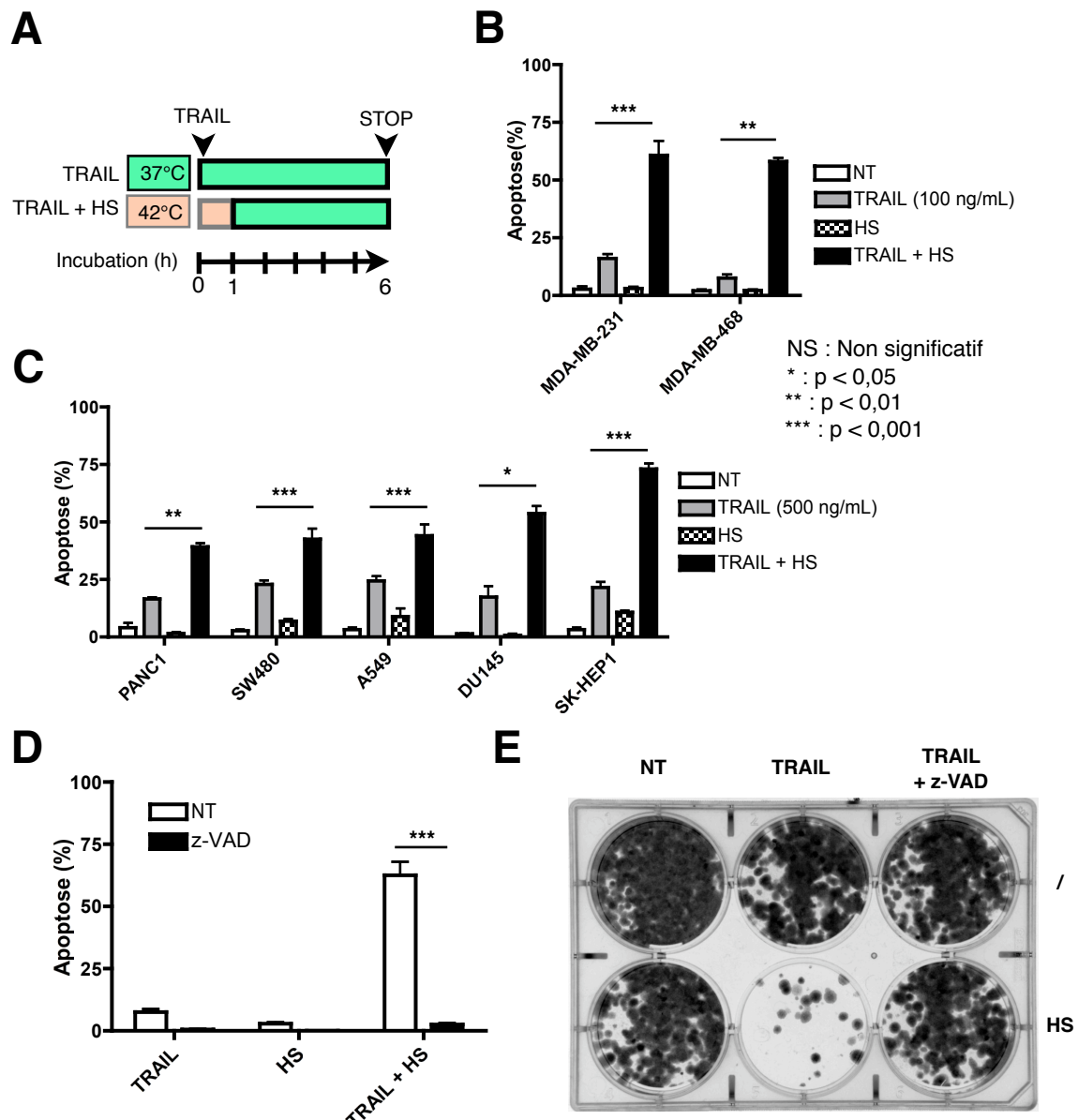


Figure 23. Un choc thermique sensibilise les cellules cancéreuses à l'apoptose induite par TRAIL

A. Schéma représentant du protocole utilisé pour les traitements des cellules cancéreuses par TRAIL. Les cellules ont été stimulées par du His-TRAIL (TRAIL) ou non (NT) à 37°C pendant 6h, ou incubées pendant 1h à 42°C en présence (T + HS) ou en absence (HS) de His-TRAIL suivi de 5h d'incubation à 37°C.

B. Les lignées cellulaires de carcinome mammaire MDA-MB-231 et MDA-MB-468 ont été traitées par 100 ng/mL de His-TRAIL avec (TRAIL + HS) ou sans choc thermique (TRAIL) conformément à la figure A. L'apoptose a été mesurée par comptages après une coloration des noyaux au Hoechst.

C. Différentes lignées cancéreuses (PANC1, SW480, A549, DU145, SK-HEP1) ont été traitées par 500 ng/mL de His-TRAIL avec (TRAIL + HS) ou sans choc thermique (TRAIL) conformément à la figure A. L'apoptose a été mesurée par comptages après une coloration des noyaux au Hoechst.

D. Les cellules MDA-MB-231 ont été pré-traitées ou non pendant 1h avec 5 μ M de l'inhibiteur des caspases, le z-VAD, puis avec du His-TRAIL à 100 ng/mL avec (TRAIL + HS) ou sans (TRAIL) choc thermique conformément à la figure A. L'apoptose a été mesurée par comptages après une coloration des noyaux au Hoechst.

E. Cinq cent cellules de la lignée MDA-MB-231 ont été traitées ou non avec 10 μ M de z-VAD pendant 1h, puis avec 500 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans choc thermique. Puis, les cellules ont étéensemencées en plaque 6 puits pendant une semaine et colorées au bleu de méthylène. (n=1)

B, C et D. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

I. L'hyperthermie restaure la sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL de manière indépendante de la voie mitochondriale

1. Un choc thermique sensibilise les cellules cancéreuses à l'apoptose induite par TRAIL

L'évaluation des propriétés anti-cancéreuses de TRAIL ou de ses dérivés chez les patients a montré les limites de ces molécules en monothérapie (Micheau *et al.*, 2013). Dans le but de pallier les phénomènes de résistance, l'intérêt d'une hyperthermie transitoire, appelée également choc thermique ou "*heat shock*" (HS), a été étudié.

Les cellules de diverses lignées cancéreuses ont été traitées avec du TRAIL recombinant étiqueté par une queue poly-histidine (*His-tag*), puis placées dans un bain-marie à 42°C pendant 1h de manière à ce que les traitements thermiques et biologiques soient faits simultanément (figure 23A). L'apoptose a été mesurée par un comptage manuel des cellules présentant un noyau condensé et/ou fractionné suite à la coloration de l'ADN par du Hoechst. Cette technique présente l'avantage de mesurer une caractéristique tardive témoignant de la mort effective des cellules à la différence de la perte d'adhérence, de l'activité des caspases ou du bourgeonnement (*blebbing*) (Somasekharan *et al.*, 2013). Un choc thermique, mentionné "HS" (*heat shock*), permet de sensibiliser efficacement les cellules des lignées de carcinomes mammaires MDA-MB-231 et MDA-MB-468 à l'apoptose induite par TRAIL (figure 23B). La combinaison de TRAIL et d'un choc thermique a un effet synergique et non additif sur l'apoptose des cellules cancéreuses. Par ailleurs, une perte d'adhérence et un phénomène de bourgeonnement (non montré) confirme que la mort induite par TRAIL est de type apoptotique (Kroemer *et al.*, 2009). Ce phénomène n'est pas spécifique aux lignées mammaires, l'efficacité du His-TRAIL est sensiblement augmentée par un choc thermique dans de nombreuses et diverses lignées cancéreuses (figure 23C) dont les lignées : PANC1 (carcinome du pancréas) ; SW480 (carcinome du colon) ; A549 (carcinome du poumon) ; DU145 (carcinome de la prostate) ; SK-HEP1 (adénocarcinome du foie). L'utilisation de l'inhibiteur général des caspases, le z-VAD, abroge complètement l'apoptose et confirme la dépendance aux caspases de la mort induite par TRAIL avec ou sans choc thermique (figure 23D). Comme attendu, une

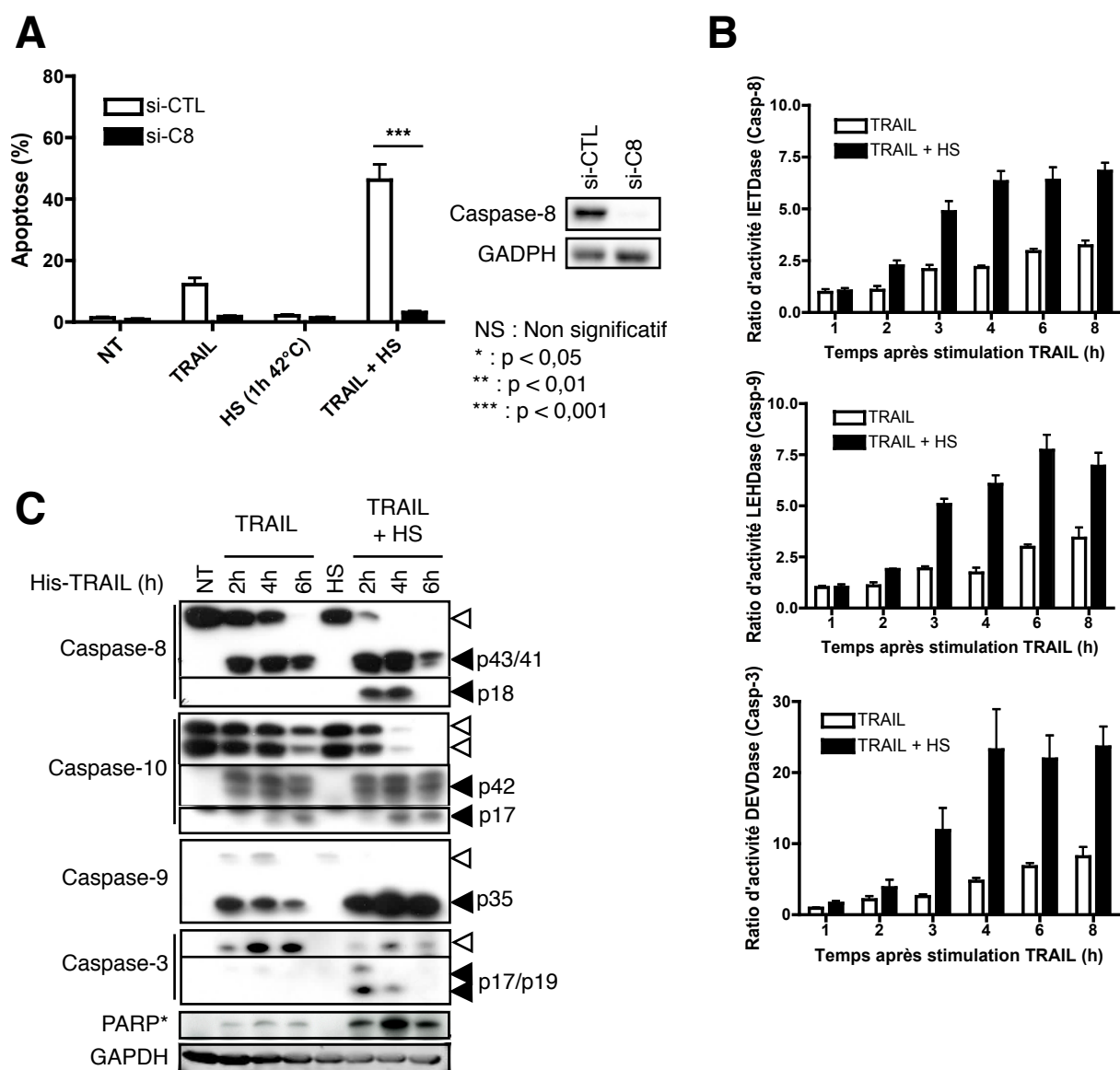


Figure 24. L'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique est dépendante de la caspase-8 et associée à l'augmentation de l'activation des caspases

A. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des *siRNA* contrôles (si-CTL) ou dirigés contre la caspase-8 (si-C8), puis elles ont traitées avec 50 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans choc thermique conformément à la figure 1A. L'apoptose a été mesurée par comptages après une coloration au Hoechst. Le niveau d'expression de la caspase-8 a été contrôlé par western blot.

B. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées avec 50 ng/mL de His-TRAIL, avec ou sans choc thermique conformément à la figure 1A. Les activités IETDase (Casp8/10), LEHDase (Casp9) et DEVDase (Casp3/7) ont été mesurées par luminométrie et rapportées à l'activité de cellules non traitées.

C. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées par 500 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans choc thermique pour le temps indiqué de 2, 4 ou 6h et conformément à la figure 1A. La fraction cytosolique a été isolée, les caspases et leurs fragments de clivage ont été détectés par western blot. Les flèches blanches indiquent les protéines natives, les flèches noires indiquent les fragments de clivage. Une expérience représentative est présentée. (n=3)

A et B. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

expérience de clonogénicité confirme la mort effective des cellules ainsi que la dépendance aux caspases de l'efficacité de la combinaison (figure 23E).

La lignée de carcinome mammaire MDA-MB-231 a été utilisée comme modèle d'étude dans la plupart des expériences suivantes en raison de sa grande sensibilité à l'hyperthermie dans l'induction de l'apoptose induite par TRAIL.

2. L'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique est dépendante de la caspase-8 et associée à l'augmentation de l'activité et du clivage des caspases

L'activation des caspases est une caractéristique majeure de l'apoptose (Kroemer *et al.*, 2009). De plus, l'apoptose induite par TRAIL est décrite pour être très dépendante de la caspase-8 (Slee *et al.*, 1996; Seol *et al.*, 2001; Eggert *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2009). Le fait que l'augmentation de l'apoptose par un choc thermique soit associée à une augmentation de l'activation des caspases a été vérifié ainsi que l'importance de la caspase-8 dans cette synergie.

Dans le modèle de carcinome mammaire MDA-MB-231, l'apoptose induite par TRAIL avec ou sans choc thermique est très dépendante de la présence de la caspase-8. Sa déplétion par ARN-interférence (ARNi/*siRNA*) abroge complètement l'effet apoptotique du co-traitement (figure 24A). Cela indique que ni la caspase-10, ni un autre mécanisme indépendant de la caspase-8 n'est responsable de l'apoptose des cellules.

L'activité des caspases a été mesurée spécifiquement par luminométrie grâce à un substrat luminogène rendu disponible par le clivage d'une séquence spécifique des caspases (8/10, 9 et 3/7). Les caspases 8 et 10 clivent la séquence peptidique IETD, on parle alors d'activité IETDase. L'activité IETDase ainsi que l'activité LEHDase, assurée par la caspase initiateur 9, sont augmentées de plus d'un facteur deux et ce dès 2h après le début du traitement (figure 24B). Cependant, aucune différence n'est observée à 1h, soit à la fin du choc thermique, ce qui laisse penser que les mécanismes de sensibilisation agissent après et non au cours du choc. L'activité DEVDase, assurée par les caspases effectrices 3 et 7, est augmentée dans des proportions encore plus importantes par un choc thermique (figure 24B). Une activation particulièrement importante de la caspase-9 et

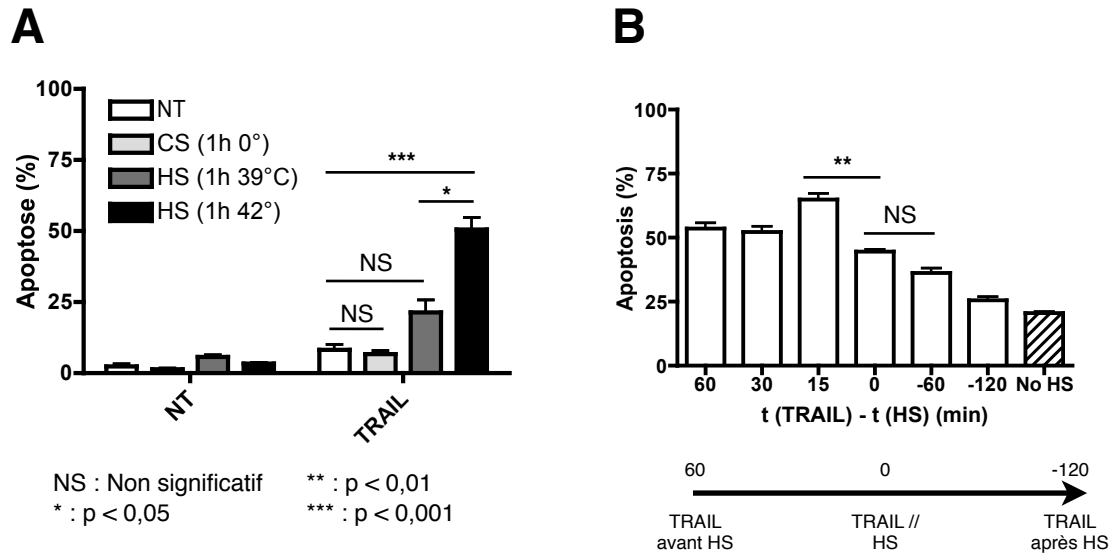


Figure 25. L'efficacité de la combinaison de TRAIL et d'un choc thermique est dépendante de la température et de la synchronisation des traitements

A. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées avec du His-TRAIL à 100 ng/mL pendant 6h dont la première heure a été incubée ou non à la température indiquée de 0, 39 ou 42°C. L'apoptose a été mesurée par comptages après une coloration au Hoechst.

B. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées avec du His-TRAIL à 100 ng/mL pendant 6h et par un choc thermique (HS) de 1h à 42°C. La synchronisation du choc thermique par rapport au traitement TRAIL est indiquée par la barre des abscisses. Le point "60" indique que le traitement par TRAIL a été fait 60 minutes avant le choc thermique, le point "-60" indique que le traitement par TRAIL a été fait 60 minutes après le choc thermique. L'apoptose a été mesurée par comptages après une coloration au Hoechst.

A et B. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

de la caspase-3 par rapport à la caspase-8, aurait indiqué que l'hyperthermie agit préférentiellement au niveau de la mitochondrie or toutes les caspases sont activées dans des proportions et à des temps comparables. Ceci laisse penser que la caspase-8, qui est la première caspase de la voie à être activée, pourrait être la cible principale de la combinaison des traitements (figure 24A et B).

Comme attendu, un choc thermique favorise le clivage des caspases initiateuses et effectrices 8, 10, 9 et 3 à la suite d'un traitement par TRAIL (figure 24C). La caspase-8 est clivée en un fragment p43/p41 avec ou sans choc thermique mais la forme p18, portant l'activité cytosolique, n'est présente qu'à la suite d'un choc thermique. De plus, les clivages de la caspase-3 et de la PARP, une cible de la caspase-3, sont bien plus importants suite à un choc thermique (figure 24C), renforçant l'hypothèse que l'hyperthermie agit en amont de la cascade des caspases.

3. L'efficacité de la combinaison de TRAIL et d'un choc thermique est dépendante de la température et de la synchronisation des traitements

La température est un paramètre évidemment important dans la synergie entre TRAIL et une hyperthermie, ce qui a déjà été montré (Yoo et Lee, 2007). Les observations de Yoo ont été confirmées et l'importance de la synchronisation des traitements pour l'induction de l'apoptose a été évaluée.

Un choc thermique de 1h à 39°C, qui pourrait correspondre à une forte fièvre, sensibilise peu l'apoptose induite par TRAIL (figure 25A). Également, un choc thermique par le froid à 0°C, mentionné "CS" (*cold shock*), ne sensibilise pas mais ne semble pas non plus protéger de l'apoptose induite par TRAIL, ce qui montre le caractère spécifique à la chaleur de la sensibilisation (figure 25A).

Par rapport à la synchronisation, si le traitement par TRAIL commence 15 minutes avant le choc thermique un gain de fonction significatif peut être acquis. À l'inverse, si le

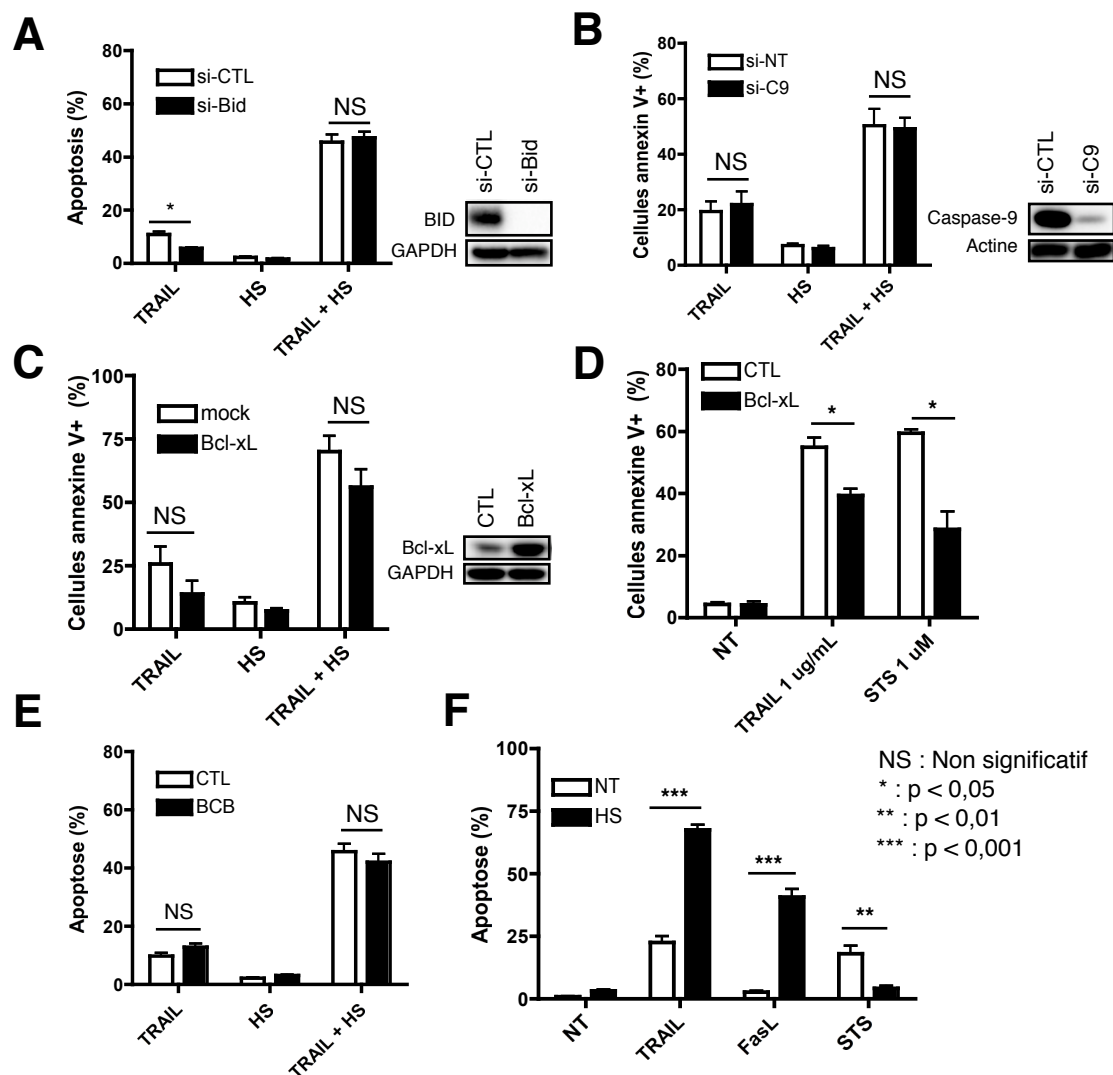


Figure 26. Un choc thermique sensibilise à TRAIL par un mécanisme indépendant de l'activation de la voie mitochondriale

A. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des *siRNA* contrôles ou dirigés contre Bid puis traitées avec 50 ng/mL de His-TRAIL, avec ou sans choc thermique, conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par comptages après une coloration au Hoechst. Les niveaux d'expression de Bid ont été contrôlés par western blot.

B. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des *siRNA* contrôles ou dirigés contre la caspase-9 puis traitées avec 50 ng/mL de His-TRAIL, avec ou sans choc thermique, conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux. Le niveau d'expression de la caspase-9 a été contrôlé par western blot.

C. Les MDA-MB-231 ont été infectées par des rétrovirus codant pour Bcl-xL ou vides (CTL), puis les cellules ont été traitées avec 50 ng/mL de His-TRAIL, avec ou sans choc thermique, conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux. Le niveau d'expression de Bcl-xL a été contrôlé par western blot.

D. Les cellules précédemment utilisées ont été traitées avec 1 µg/mL de His-TRAIL pendant 6h ou 1 µM de l'inhibiteur de PKC, la staurosporine, pendant 24h. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux.

E. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées avec un inhibiteur de Bax (*Bax channel blocker* - BCB) puis avec 50 ng/mL de His-TRAIL, avec ou sans choc thermique, conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par comptages après une coloration au Hoescht.

F. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées avec 50 ng/mL de His-TRAIL, un surnageant de cellules productrices de FasL ou 500 nM de staurosporine, avec ou sans choc thermique, pendant 16h. L'apoptose a été mesurée par comptages après une coloration au Hoechst.

A, B, C, D, E et F. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

traitement par TRAIL est fait après le choc thermique, une réduction de l'efficacité de la combinaison peut être observée (figure 25B). Ceci indique que l'efficacité du mécanisme de sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie est modulable et sensible.

4. Un choc thermique sensibilise à TRAIL par un mécanisme indépendant de l'activation de la voie mitochondriale

Plusieurs études ont avancé l'hypothèse que l'activation de la mitochondrie est responsable de la sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie (Hermisson *et al.*, 2000; Yoo et Lee, 2008; Song *et al.*, 2012a). Cette hypothèse a été vérifiée en induisant un blocage de la voie mitochondriale par différentes stratégies.

La déplétion par des *siRNA* de la protéine Bid, qui fait le lien entre les caspases 8, 10 et la voie mitochondriale, affecte significativement l'apoptose induite par TRAIL seul mais pas en combinaison avec un choc thermique (figure 26A). La déplétion de la caspase-9 confirme ce résultat bien que dans ce modèle celle-ci ne semble pas affecter l'apoptose induite par TRAIL seul (figure 26B). Le blocage de la mitochondrie par l'expression ectopique de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL, à l'aide de vecteurs rétroviraux, ne semble affecter que légèrement l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique (figure 26C). Par comparaison, Bcl-xL affecte de manière importante la mort induite par l'inhibiteur des PKC, la staurosporine (figure 26D), décrite pour être dépendante de la mitochondrie (Tafani *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008). Bcl-xL affecte également l'apoptose induite par TRAIL à une plus forte concentration et sans choc thermique (figure 26D). Pour finir, l'utilisation d'un inhibiteur chimique dirigé contre la protéine Bax (*Bax channel blocker* - BCB), n'affecte pas l'apoptose induite par TRAIL avec ou sans un choc thermique (figure 26E). Ces résultats indiquent que la mitochondrie a au mieux un rôle mineur et passif dans la sensibilisation par l'hyperthermie.

La sensibilisation induite par un choc thermique n'est pas spécifique à TRAIL mais commune à l'apoptose extrinsèque. En effet l'apoptose induite par FasL, un membre de la famille du TNF proche de TRAIL, est sensiblement augmentée par un choc thermique (figure 26F) conformément aux observations de Tran (Tran *et al.*, 2003). À l'inverse, la mort induite par la staurosporine n'est pas augmentée à la suite d'un choc thermique, au

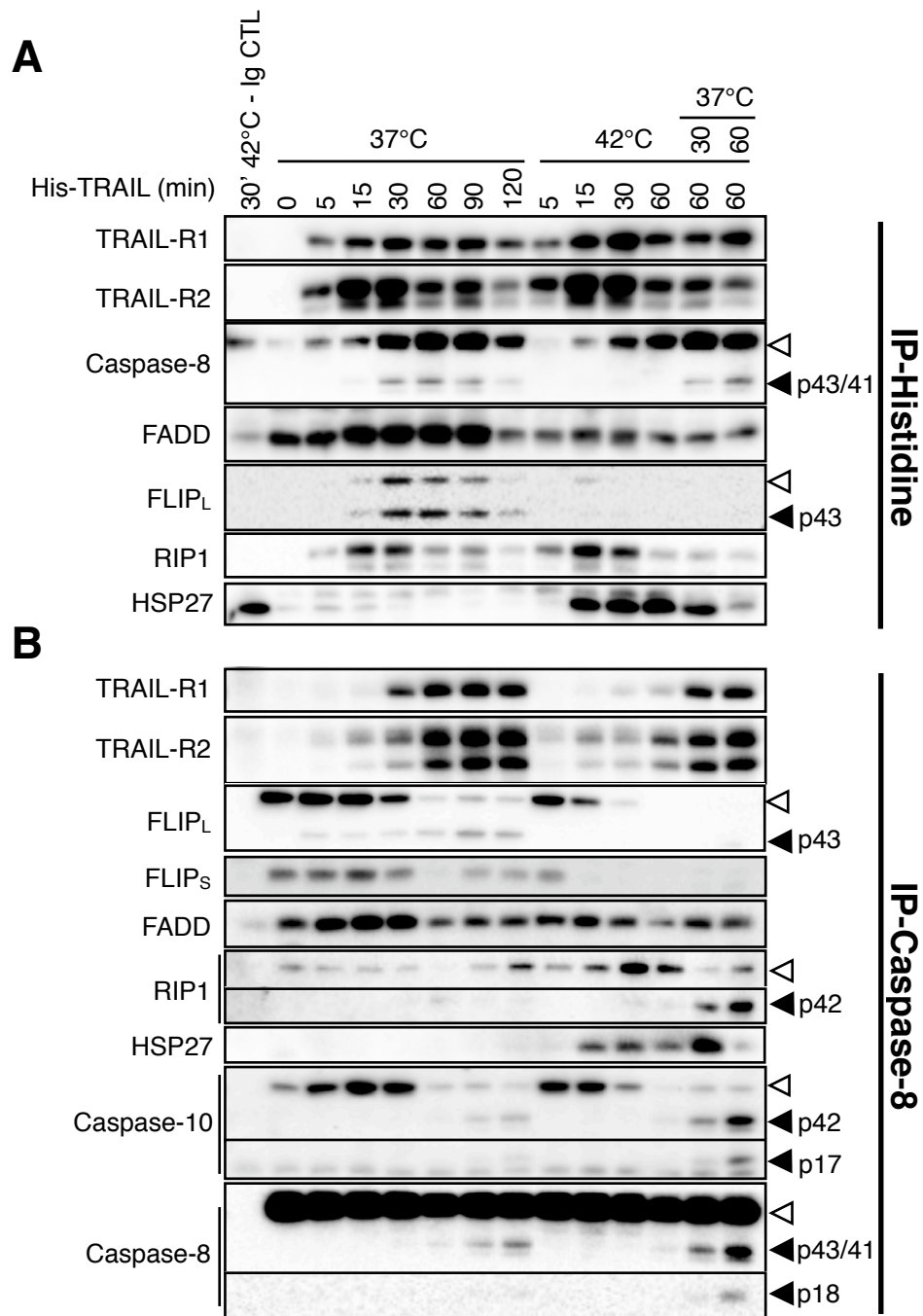


Figure 27. Un choc thermique retarde la formation du DISC et inhibe le recrutement de FLIP en son sein

A et B. Les cellules MDA-MB-231 ont été stimulées avec 500 ng/mL de His-TRAIL avec (42°C) ou sans (37°C) choc thermique pour un temps d'incubation compris entre 5 et 120 minutes aux températures indiquées. Les cellules ont été lysées dans un tampon contenant 1% de NP-40 et un anticorps anti-histidine, anti-caspase-8 ou un isotype contrôle (Ig CTL) ont été utilisés pour une immunoprécipitation (voir matériel et méthode). Les protéines ont été détectées par Western blot. Les flèches blanches indiquent les protéines natives, les flèches noires indiquent les fragments de clivage. Une expérience représentative est présentée. (n=3)

contraire, une protection des cellules peut être observée dans ces conditions (figure 26F). Ceci appuie l'hypothèse que l'hyperthermie cible des mécanismes en amont de la cascade d'activation des caspases et que la mitochondrie n'est pas impliquée dans le mécanisme de sensibilisation. La protection vis à vis de la mort induite par la staurosporine, engendrée par un choc thermique, pourrait être expliquée par le blocage de la voie mitochondriale suite à la surexpression des HSP (Paul *et al.*, 2002).

5. Un choc thermique retarde la formation du DISC et inhibe le recrutement de FLIP en son sein

La mitochondrie n'étant pas impliquée dans la sensibilisation, l'augmentation de la fluidité membranaire au cours d'un choc thermique pourrait en être responsable et favoriser la formation du DISC et/ou l'activation de la caspase-8 en son sein (Moulin *et al.*, 2007b; Csoboz *et al.*, 2013). Pour vérifier ces suppositions, des expériences d'immunoprécipitation ciblant la caspase-8 ou TRAIL à différents temps d'incubation à 37°C ou 42°C ont été effectuées. Les traitements ont été effectués en cohérence avec les expériences précédentes et à venir. Dans le cas d'un traitement par une hyperthermie, les cellules ont donc été exposées à un choc thermique d'une heure maximum et le reste de l'incubation a été faite à 37°C (figure 23A). Les immunoprécipitations ont été faites dans un tampon de lyse sans détergeant ionique contenant 1% de NP-40 afin de solubiliser l'essentiel des fractions membranaires sans dissocier les complexes protéiques.

L'immunoprécipitation du ligand, via son étiquette histidine (His-tag) montre que l'hyperthermie provoque de nombreuses différences dont la plus marquante est une totale disparition de FLIP_L, l'inhibiteur majeur de la voie TRAIL (figure 27A) (Shirley et Micheau, 2013). Alors que FLIP_L est recruté et clivé au sein du DISC à 37°C, son association est complètement inhibée pendant mais également après un choc thermique à 42°C. Cela pourrait être expliqué par la dégradation de FLIP au cours d'une hyperthermie en cohérence avec l'étude de Song et de son équipe (Song *et al.*, 2013a). Bien que la fixation de TRAIL sur ses récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 ne soit pas significativement affectée, l'hyperthermie diminue le recrutement de FADD. Le recrutement ainsi que le clivage de la caspase-8 en fragments p43 et p41 aux temps d'incubation de 30 et 60 minutes sont également inhibés. Ceci n'est plus observé à 90 et 120 minutes après un choc thermique où le recrutement et l'activation de la caspase-8 sont de nouveau effectifs. Ces

observations indiquent que l'hyperthermie provoque un retard dans la formation des complexes. Par ailleurs, le recrutement de la kinase RIP1 est observé de manière transitoire entre 15 et 30 minutes et semble légèrement favorisé par un choc thermique. De manière remarquable, la protéine de choc thermique HSP27 semble recrutée dans le DISC au cours du choc thermique (figure 27A). Cette liaison pourrait cependant être non spécifique car elle apparaît également dans le point contrôle de l'expérience (Ig CTL), où l'immunoprécipitation a été faite à l'aide d'un anticorps non spécifique de l'histidine sur un lysat de cellules traitées 30 minutes par un choc thermique.

L'immunoprécipitation de la caspase-8 donne un point de vue complémentaire à l'immunoprécipitation de TRAIL (figure 27B). En cohérence avec l'expérience précédente, la liaison de FLIP_L et de FLIP_S à la caspase-8, observée de manière surprenante à l'état basal (0'), est complètement abrogée avec un choc thermique mais également après le choc thermique. Ceci est associé à une meilleure activation des caspases 8 et 10 aux temps tardifs avec l'apparition des fragments p18 et p17. Le recrutement des récepteurs à TRAIL ainsi que celui de FADD sur la caspase-8, est également inhibé de manière passagère au cours du choc thermique (30 et 60 minutes à 42°C), en cohérence avec les précédentes observations. Par ailleurs, la liaison entre RIP1 et la caspase-8 est sensiblement augmentée par un choc thermique et un fragment de clivage de RIP1 p42 est observé aux temps où les caspases 8 et 10 sont clivées, ce qui pourrait indiquer un rôle de RIP1 dans la sensibilisation par l'hyperthermie.

HSP27 se retrouve aussi liée à la caspase-8 au cours du choc thermique, de manière à priori spécifique (figure 27B). La spécificité de liaison d'HSP27 au DISC ou à la caspase-8 est une question difficile à appréhender car en tant que chaperon activée au cours d'une hyperthermie, cette protéine est susceptible de se lier à toute protéine dénaturée présente sur les billes sépharose ce qui peut être le cas de la protéine G, de l'anticorps immunoprécipitant ou encore d'une protéine liée aux billes de manière également non spécifique.

Pour résumer cette partie, contrairement à ce qui aurait pu être attendu, notamment par rapport au fait que la fluidité membranaire est augmentée avec la température, l'hyperthermie ne favorise pas la formation du DISC mais à l'inverse, semble la retarder. Par contre, à 30 et 60 minutes après un choc thermique le DISC se forme d'une manière très efficace et permet le clivage complet des caspases 8 et 10. Cela est permis par la

complète absence de FLIP, l'inhibiteur principal de la caspase-8, que ce soit dans le DISC ou associé à la caspase-8 ainsi que pendant le choc thermique ou après celui-ci. Également un choc thermique permet le recrutement d'HSP27 ce qui pourrait révéler qu'un ou plusieurs constituants du DISC soient dénaturés par le choc thermique. Le recrutement de RIP1 sur la caspase-8 est également augmenté avec l'hyperthermie. Ces observations ouvrent donc un ensemble de perspectives à explorer pour la compréhension d'un potentiel rôle de ces différents acteurs dans la sensibilisation à TRAIL par une hyperthermie.

6. Les protéines constitutives du DISC de TRAIL ne sont pas présentes dans les radeaux lipidiques

L'inhibition de la formation du DISC au cours d'un choc thermique précédemment observé (figure 27), laisse la possibilité qu'un complexe puisse se former dans une fraction insoluble au tampon de lyse utilisé à savoir, les radeaux lipidiques (Delmas *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2007). De plus, l'activation des caspases initiatrices au sein de ces radeaux peut s'avérer particulièrement importante et pourrait expliquer en partie l'efficacité de la combinaison (Song *et al.*, 2007). Cette possibilité a été évaluée en purifiant les radeaux lipidiques par ultracentrifugation sur un gradient de sucrose puis en révélant la présence des principaux constituants du DISC à savoir les récepteurs et la caspase-8.

Le marqueur des radeaux lipidiques, la Flotilline-1, est détecté particulièrement dans les fractions 2 et 3 qui contiennent donc les radeaux (figure 28A). Dans ce modèle, TRAIL-R1, à la différence de TRAIL-R2, est très présent dans ces radeaux lipidiques. TRAIL-R2 et la caspase-8 sont présents dans les fractions 7 à 10, constituées du cytosol et de la membrane plasmique solubilisée dans le tampon de lyse. Le traitement des cellules par TRAIL induit une faible translocation de la caspase-8 dans les fractions 3 à 6, ce qui pourrait révéler la présence de celle-ci dans les radeaux après son recrutement sur TRAIL-R1. Au contraire, ni la translocation de la caspase-8, ni celle de TRAIL-R2 n'est augmentée ou induite lorsque les cellules sont traitées par TRAIL et par un choc thermique. Au contraire, un traitement par TRAIL, particulièrement avec un choc thermique, augmente la présence de TRAIL-R1 dans les fractions 7 à 10. Cela pourrait indiquer que TRAIL-R1 sort des radeaux lipidiques pour former un DISC avec TRAIL-R2 ou que les radeaux sont solubilisés au cours d'un choc thermique.

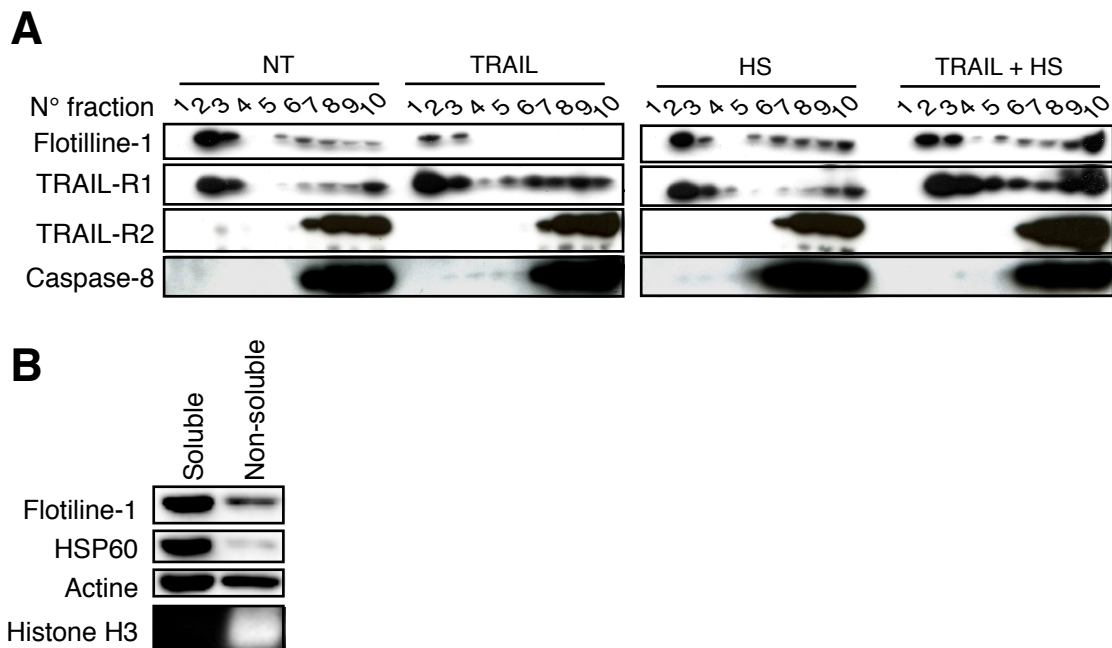


Figure 28. Les protéines constitutives du DISC de TRAIL ne sont pas présentes dans les radeaux lipidiques

A. Les cellules MDA-MB-231 ont été stimulées avec 500 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans choc thermique pendant 30 minutes. Les cellules ont été lysées, les radeaux isolés par ultracentrifugation (voir matériel et méthode) et les protéines ont été détectées par Western blot. Une expérience représentative est présentée. (n=3)

B. Les cellules MDA-MB-231 ont été lysées partiellement dans un tampon contenant 1% de NP-40, les fractions solubles et insolubles ont été séparées par centrifugation (voir matériel et méthode). Les protéines ont été détectées par Western blot. La Flotilline-1 est un marqueur des radeaux lipidiques, HSP60 est un marqueur de la mitochondrie et l'histone H3 est un marqueur du noyau. (n=1)

Par ailleurs, la Flottiline-1 est majoritairement soluble dans un tampon de lyse contenant 1% de NP-40 (figure 28B), ce qui indique que les radeaux lipidiques ont été majoritairement solubilisés pour les précédentes expériences d'immunoprécipitation. En conclusion, ces résultats appuient le fait que l'hyperthermie inhibe la formation du DISC de manière transitoire et indiquent que ses constituants ne sont pas séquestrés dans les radeaux lipidiques.

Conclusion intermédiaire

Pour résumer cette première partie, ces résultats indiquent qu'un choc thermique est un moyen efficace de sensibiliser de nombreuses lignées cancéreuses à l'apoptose induite par TRAIL. Cet effet de sensibilisation est commun aux voies d'apoptose extrinsèques, très dépendant de la caspase-8 et indépendant des voies d'apoptose intrinsèques. Également, un choc thermique induit plusieurs changements majeurs dans la formation du DISC à savoir :

- un retard dans la formation du DISC et dans l'activation de la caspase-8
- une meilleure activation des caspases 8 et 10 après un choc thermique
- l'absence de l'inhibiteur FLIP pendant et après un choc thermique
- la présence d'HSP27 sur la caspase-8 au cours du choc thermique
- l'augmentation du recrutement et du clivage de RIP1 dans le DISC et sur la caspase-8

Ces observations ouvrent de nombreuses pistes à explorer pour comprendre les mécanismes impliqués ou non dans la synergie entre TRAIL et l'hyperthermie.

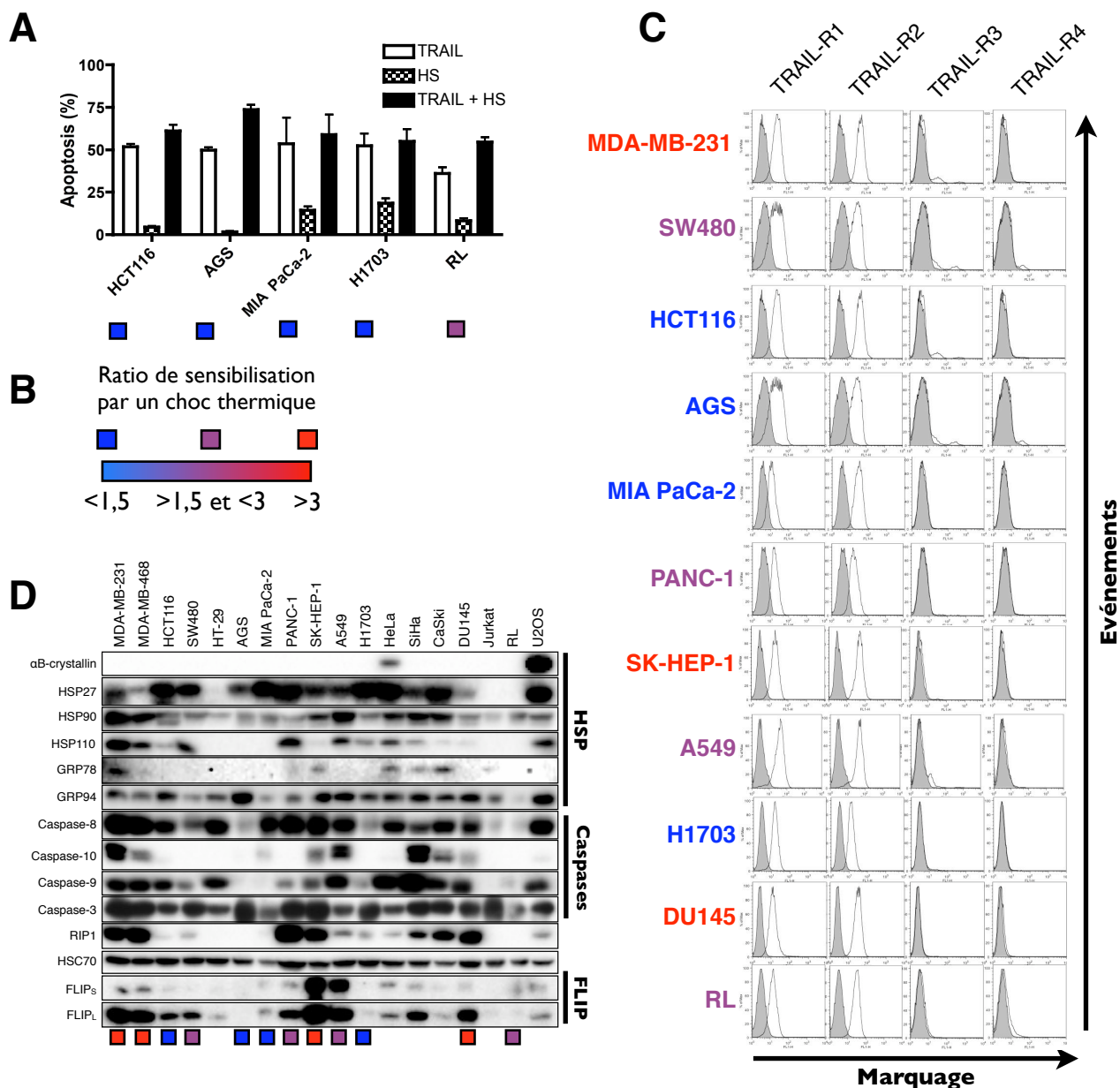


Figure 29. La quantité de FLIP est corrélée à la réponse des cellules cancéreuses à l'hyperthermie

A. Différentes lignées cancéreuses ont été traitées avec 100 ng/mL (HCT116, H1703 et MIA PaCa-2) ou 500 ng/mL de His-TRAIL (AGS et RL), avec ou sans choc thermique, conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par comptages après une coloration au Hoechst. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

B. Un ratio de sensibilisation par un choc thermique a été calculé selon la formule $R = A_{T+HS}/A_T$ où R est le ratio de sensibilisation, A_{T+HS} est le pourcentage de cellules apoptotiques après un traitement par TRAIL avec un choc thermique et A_T est le pourcentage de cellules apoptotiques après un traitement par TRAIL. Lorsque R est inférieur à 1,5 la lignée est marquée en **bleu**, lorsque R est compris entre 1,5 et 3 la lignée est marquée en **violet**, lorsque R est supérieur à 3 la lignée est marquée **rouge**.

C. Les récepteurs à TRAIL ont été détectés par immunomarquage et par cytométrie en flux sur différentes lignées cancéreuses. Le pic blanc représente le marquage spécifique, le pic gris représente le marquage de l'isotype contrôle. (n=1)

D. Les cellules de différentes lignées cancéreuses ont été lysées en tampon de lyse NP-40 1%. La quantité de protéine a été ajustée entre les points et les protéines ont été détectées par western blot. (n=1)

II. La sensibilisation à TRAIL par un choc thermique est dépendante de l'agrégation de FLIP

1. La quantité de FLIP est corrélée à la réponse des cellules cancéreuses à l'hyperthermie

Dans le but d'identifier les cibles importantes de l'hyperthermie et de comprendre les mécanismes impliqués dans la sensibilisation à TRAIL, des données ont été accumulées sur certaines caractéristiques que possèdent les lignées cellulaires cancéreuses à disposition. Ainsi, sur près d'une vingtaine de lignées, la capacité de réponse à l'hyperthermie a été mise en relation avec l'expression membranaire des récepteurs de TRAIL et l'expression de certaines protéines impliquées dans l'apoptose induite par TRAIL ainsi que certaines HSP.

Dans certaines lignées cellulaires précédemment présentées, un choc thermique induit une forte sensibilisation à l'apoptose induite par TRAIL (figure 23B et C - page 94). Cependant, l'élévation de la température ne présente pas ou peu d'effet dans d'autres lignées vis à vis de l'apoptose induite par TRAIL (figure 29A). Un ratio de sensibilisation a été calculé en divisant le pourcentage de cellules apoptotiques suite à un traitement par TRAIL avec un choc thermique par le pourcentage de cellules apoptotiques suite à un traitement par TRAIL sans choc thermique (figure 29B). Les lignées ayant un haut ratio de sensibilisation (>3) sont représentées en rouge, tandis que les lignées ayant un faible ratio de sensibilisation ($<1,5$) sont représentées en bleu. Les lignées intermédiaires sont représentées en violet. L'expression membranaire des récepteurs à TRAIL a été mesurée par cytométrie. Les récepteurs agonistes TRAIL-R1 et TRAIL-R2 sont exprimés de manière relativement uniforme et les récepteurs antagonistes TRAIL-R3 et TRAIL-R4 ne sont pas exprimés dans le groupe de lignées étudiées (figure 29C). Il est donc impossible de spéculer sur un rôle du niveau d'expression des récepteurs à TRAIL dans le mécanisme de sensibilisation. Cependant, la quantification relative de certaines protéines par Western blot (figure 29D) révèle que l'expression de FLIP et particulièrement de FLIP_L, semble positivement corrélée avec l'efficacité de sensibilisation par un choc thermique (figure 23B, 23C, 29A et 29D). En effet, les lignées MDA-MB-231, MDA-MB-468, SK-HEP-1 et DU145 répondent beaucoup à l'hyperthermie et expriment de grandes quantités de FLIP. Inversement, les lignées MIA PaCa-2 et H1703 ne répondent pas au choc thermique et n'expriment pas FLIP de manière détectable (figure 29A et D).

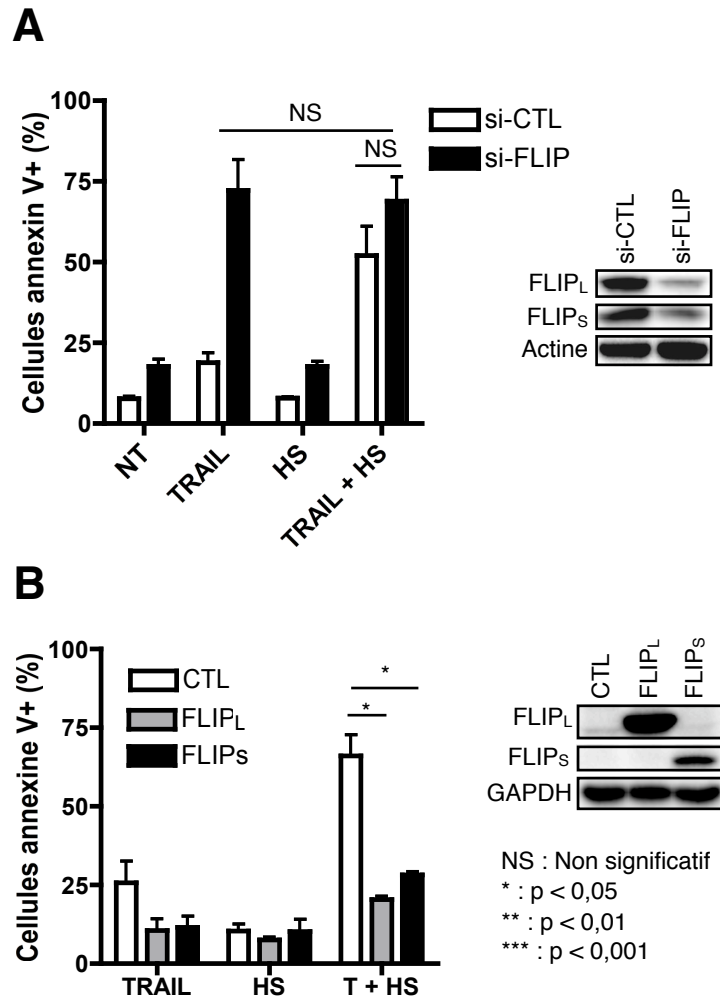


Figure 30. La sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie est dépendante de FLIP

A. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des *siRNA* contrôles ou dirigés contre FLIP puis traitées avec 50 ng/mL de His-TRAIL, avec ou sans choc thermique conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux. Les niveaux d'expression de FLIP ont été contrôlés par Western blot.

B. Les MDA-MB-231 ont été infectées par des rétrovirus codant pour VSV-FLIP_L, VSV-FLIP_S ou vides (CTL), puis les cellules ont été traitées avec 50 ng/mL de His-TRAIL, avec ou sans choc thermique conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux. Les niveaux d'expression de FLIP ont été contrôlés par Western blot.

A et B. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

2. La sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie est dépendante de FLIP

Le rôle de FLIP a été investigué en priorité du fait de la corrélation précédemment observée. De plus, FLIP est un acteur majeur de l'apoptose induite par TRAIL et son absence dans le DISC et en liaison avec la caspase-8 (figure 27 - page 102) est une piste privilégiée pour expliquer la synergie opérant entre TRAIL et un choc thermique. Pour étudier l'importance de FLIP dans les mécanismes, celui-ci a été déplété à l'aide de *siRNA* ou exprimé de manière ectopique par des infections rétrovirales.

La déplétion de FLIP sensibilise fortement les MDA-MB-231 à l'apoptose induite par TRAIL, dans des proportions comparables à un choc thermique (figure 30A). De plus, en l'absence de FLIP un choc thermique ne sensibilise pas davantage à l'apoptose induite par TRAIL. Ces résultats valident la corrélation précédemment observée entre l'expression FLIP et la sensibilité des cellules cancéreuses à l'hyperthermie et indiquent que l'absence de FLIP dans les complexes est nécessaire et suffisante à cette sensibilisation. Inversement, l'expression ectopique de FLIP_L ou de FLIP_S par des vecteurs rétroviraux offre une protection presque complète contre l'apoptose induite par TRAIL avec ou sans choc thermique (figure 30B). Cela confirme que FLIP est capable de protéger efficacement de l'apoptose induite par TRAIL, que le mécanisme de sensibilisation est dépendant de la quantité de FLIP présente.

3. FLIP devient insoluble au cours d'un choc thermique

FLIP n'est plus recruté dans le DISC et sur la caspase-8 pendant et après un choc thermique (figure 27). De plus, son absence est directement responsable de la sensibilisation des cellules par l'hyperthermie (figure 30). En ce sens, des études ont montré que l'hyperthermie a pour effet d'induire l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de FLIP dans diverses lignées cancéreuses expliquant de fait la synergie opérant entre TRAIL et l'hyperthermie (Tran *et al.*, 2003; Meinander *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2013a). La dégradation éventuelle de FLIP au cours d'une hyperthermie a été évaluée par Western blot.

Une lyse totale des cellules MDA-MB-231 ayant subi le même traitement que précédemment montre que FLIP_L est toujours présent en grande quantité au cours et

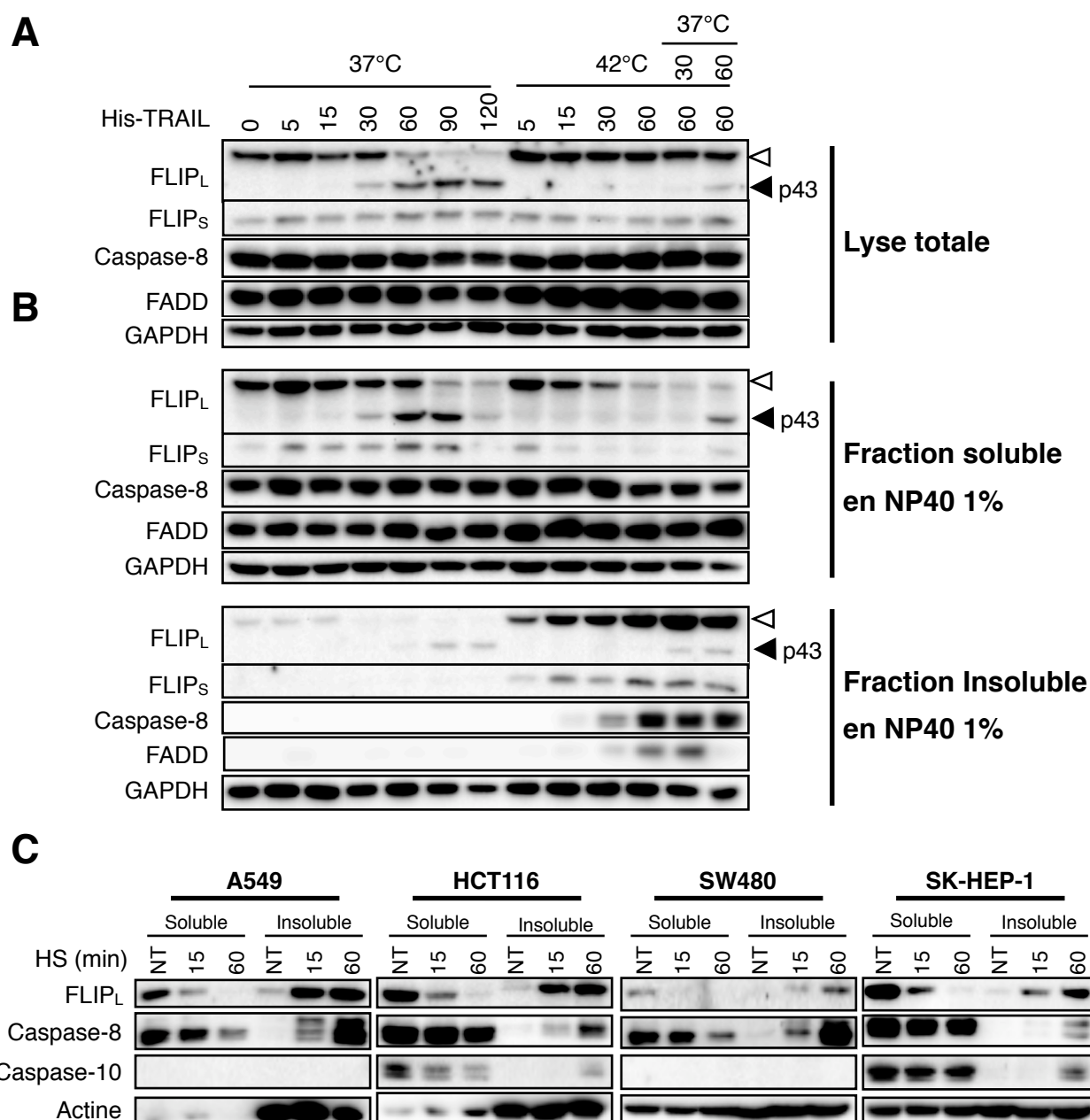


Figure 31. FLIP devient insoluble au cours d'un choc thermique

A. Les cellules MDA-MB-231 ont été stimulées avec 500 ng/mL de His-TRAIL, avec (42°C) ou sans (37°C) choc thermique, aux températures et aux temps d'incubation indiqués. Les cellules ont été lysées totalement, soniquées et les protéines ont été détectées par western blot. Les flèches blanches indiquent les protéines natives, les flèches noires indiquent les fragments de clivage.

B. Les cellules MDA-MB-231 ont été stimulées comme précédemment puis lysées partiellement dans un tampon contenant 1% de NP-40, les fractions solubles et insolubles ont été isolées par centrifugation et chargées séparément (voir matériel et méthode). Les protéines ont été détectées par western blot. Les flèches blanches indiquent les protéines natives, les flèches noires indiquent les fragments de clivage.

C. Les cellules A549 (poumon), HCT116 (colon), SW480 (colon) et SK-HEP-1 (Foie) ont subi un choc thermique le temps indiqué. Les cellules ont été lysées partiellement dans un tampon contenant 1% de NP-40 (voir matériel et méthode), les fractions solubles et insolubles ont été chargées et les protéines ont été détectées par western blot. (n=1)

A et B. Une expérience représentative est présentée. (n=3)

après un choc thermique. De plus, TRAIL induit le clivage de FLIP_L à 37°C mais pas à 42°C, ce qui montre l'absence de proximité entre FLIP et la caspase-8 provoquée par un choc thermique (figure 31A). L'hyperthermie induit une légère dégradation de FLIP_L mais pas de perte visible pour FLIP_S, ce qui ne peut pas expliquer son absence précédemment observée dans le DISC et sur la caspase-8. Les conditions des traitements (temps et température) sont pourtant similaires à celles mentionnées dans les études précédemment citées (Meinander *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2013a).

Si FLIP est toujours présent dans les cellules au cours d'un choc thermique, il pourrait ne plus être localisé dans le cytosol, ce qui rendrait impossible son recrutement dans le DISC. Pour vérifier cette hypothèse, cette expérience a été répétée en utilisant un tampon sans détergeant ionique contenant 1% de NP-40, qui est équivalent à celui utilisé pour les expériences d'immunoprécipitation. Ce tampon permet de solubiliser une grande partie des fractions membranaires et de récupérer les protéines cytosoliques, parmi lesquelles se trouvent les constituants du DISC (fraction "soluble"). Les protéines présentes dans le culot après centrifugation, composé des noyaux et des fractions très insolubles (figure 28B - page 106), sont resuspendues dans un tampon de lyse fort contenant 1% de SDS (fraction "insoluble"). Cette technique rudimentaire de fractionnement a permis de mettre en évidence que la protéine FLIP, à la suite d'un choc thermique, quitte la fraction cytosolique au profit d'une fraction insoluble (figure 31B), ce qui explique pourquoi FLIP n'est pas recruté dans le DISC. D'autres constituants du DISC sont également retrouvés dans une fraction insoluble dans ces conditions, dont les caspases 8 et 10 ainsi que FADD. Cependant, ces protéines restent en majorité dans les fractions solubles, ce qui permet la correcte formation des complexes.

L'insolubilisation de FLIP au cours d'une hyperthermie est un mécanisme général. En effet, quatre lignées cancéreuses humaines supplémentaires ont été testées sur ce paramètre à savoir : les lignées A549 (carcinome de poumon), HCT116 (adénocarcinome du colon), SW480 (adénocarcinome du colon) et SK-HEP1 (carcinome du foie). Dans toutes ces lignées, FLIP_L se retrouve insolubilisé totalement après 60 voir 15 minutes de choc thermique (figure 31C). La caspase-8 peut également être fortement insolubilisée dépendamment de la lignée en question.

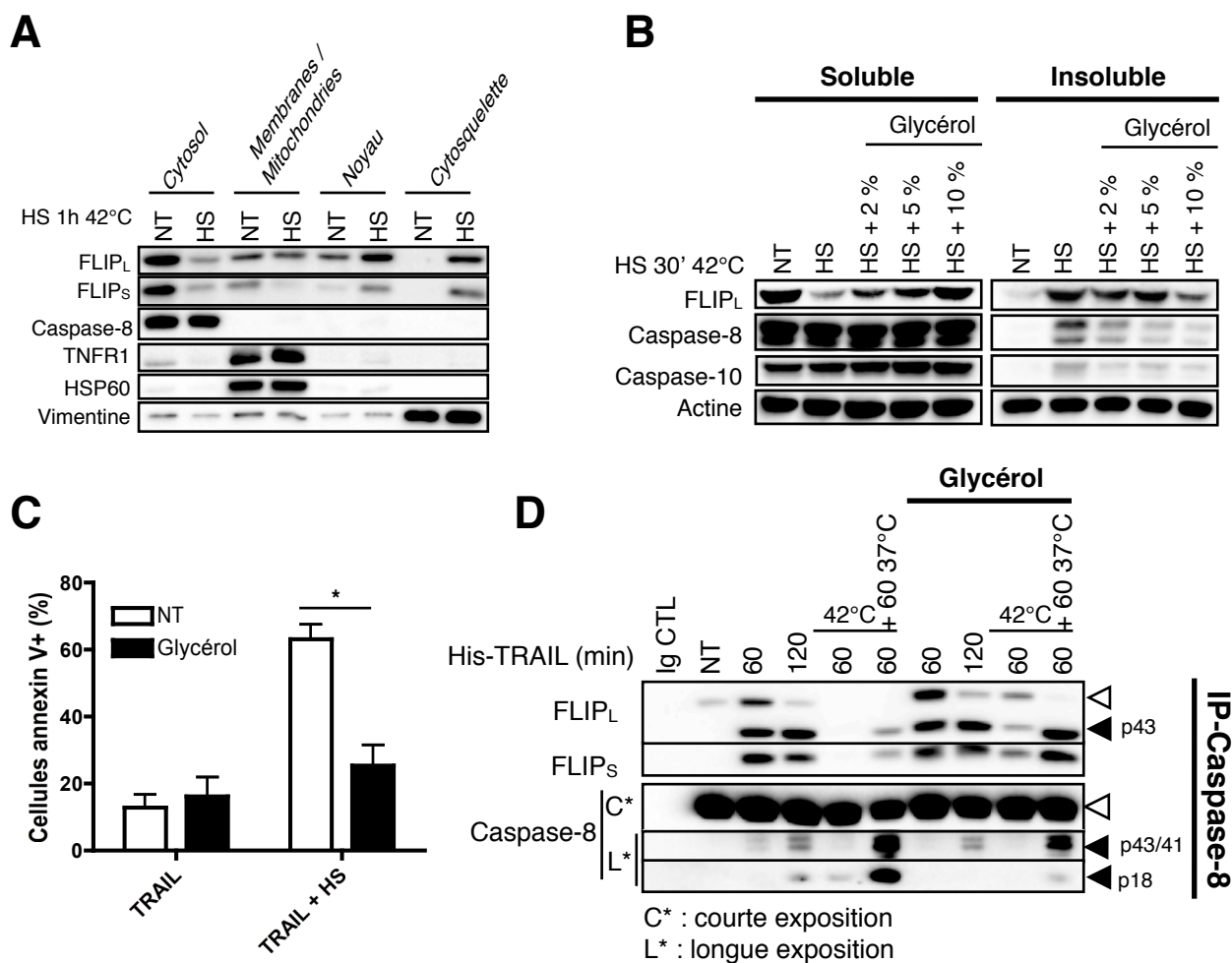


Figure 32. Le glycérol inhibe l'aggrégation de FLIP et restaure sa fonction au cours d'un choc thermique

A. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées ou non par un choc thermique de 30 minutes à 42°C puis elles ont été fractionnées à l'aide d'un kit commercial (voir matériel et méthode). Les protéines ont été détectées par western blot. Le TNFR1 et la vimentine ont été utilisés comme contrôle de fraction. (n=1)

B. Les cellules MDA-MB-231 ont été mises en présence ou non de la concentration indiquée de glycérol pendant 1h puis elles ont subi un choc thermique de 30 minutes à 42°C. Les cellules ont été partiellement lysées dans un tampon contenant 1% de NP-40 (voir matériel et méthode), les fractions solubles et insolubles ont été chargées et les protéines ont été détectées par western blot.

C. Les cellules MDA-MB-231 ont été mises en présence ou non de 5 % de glycérol pendant 1h, puis les cellules ont été traitées avec 50 ng/mL de His-TRAIL, avec ou sans choc thermique conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins trois expériences indépendantes.

D. Les cellules MDA-MB-231 ont été mises en présence ou non de 5 % de glycérol pendant 1h, puis les cellules ont été traitées avec 500 ng/mL de His-TRAIL 60 ou 120 minutes avec un choc thermique ou non. Les cellules ont été lysées, la caspase-8 a été immunoprécipitée par un anticorps spécifique ou un isotype contrôle (Ig CTL) (voir matériel et méthode) et les protéines ont été détectées par western blot. Les flèches blanches indiquent les protéines natives, les flèches noires indiquent les fragments de clivage.

B et D. Une expérience représentative est présentée. (n=3)

4. Le glycérol inhibe l'agrégation de FLIP et restaure sa fonction au cours d'un choc thermique

La disparition de FLIP des fractions solubles d'un tampon de lyse de NP-40 1%, à la suite d'un choc thermique, pourrait s'expliquer soit par une translocation de cette protéine dans une fraction subcellulaire insoluble au tampon, tel que le noyau, soit par la formation d'agrégats protéiques insolubles. L'élévation de la température est connue pour induire l'agrégation des protéines, parfois appelée précipitation des protéines (Dubois *et al.*, 1991; Vidair *et al.*, 1996). Pour répondre à ces hypothèses, un kit de fractionnement subcellulaire a été utilisé pour mettre en évidence une éventuelle translocation de FLIP dans le noyau ou dans une autre fraction insoluble. Pour mettre en évidence une éventuelle agrégation de FLIP, du glycérol a été supplémenté au milieu de culture. Le glycérol est capable de stabiliser les chaînes hydrophobes des protéines dénaturées et d'inhiber la formation d'agrégats protéiques induits par la chaleur (Edington *et al.*, 1989; Dubois *et al.*, 1991; Vagenende *et al.*, 2009).

Une expérience de fractionnement subcellulaire montre qu'au cours d'une hyperthermie FLIP quitte le cytosol pour se retrouver dans des fractions moins solubles, en particulier dans les fractions nucléaires et cytosquelettiques. Ce résultat pourrait indiquer que des agrégats de différentes tailles et de différentes solubilités sont formés ou en cours de formation pendant un choc thermique. Ces observations sont également en cohérence avec les résultats obtenus par Ishioka qui montrent que lorsque FLIP est agrégé, il peut être isolé dans la fraction cellulaire cytosquelettique et en moindre mesure dans la fraction nucléaire (Ishioka *et al.*, 2007).

La présence de glycérol dans le milieu de culture, à des concentrations de 2, 5 ou 10%, inhibe presque entièrement et de manière dose-dépendante la translocation de FLIP de la fraction soluble à la fraction insoluble (figure 32B). Ce phénomène peut être observé en moindre mesure pour la caspase-8 et la caspase-10. En conclusion, cette expérience indique que l'insolubilisation de FLIP est due à son agrégation au cours d'un choc thermique. En ce sens, FLIP est une protéine décrite pour être très instable et avoir une demi-vie courte. De plus, celle-ci est capable de s'agréger suite à sa simple surexpression (Ishioka *et al.*, 2007).

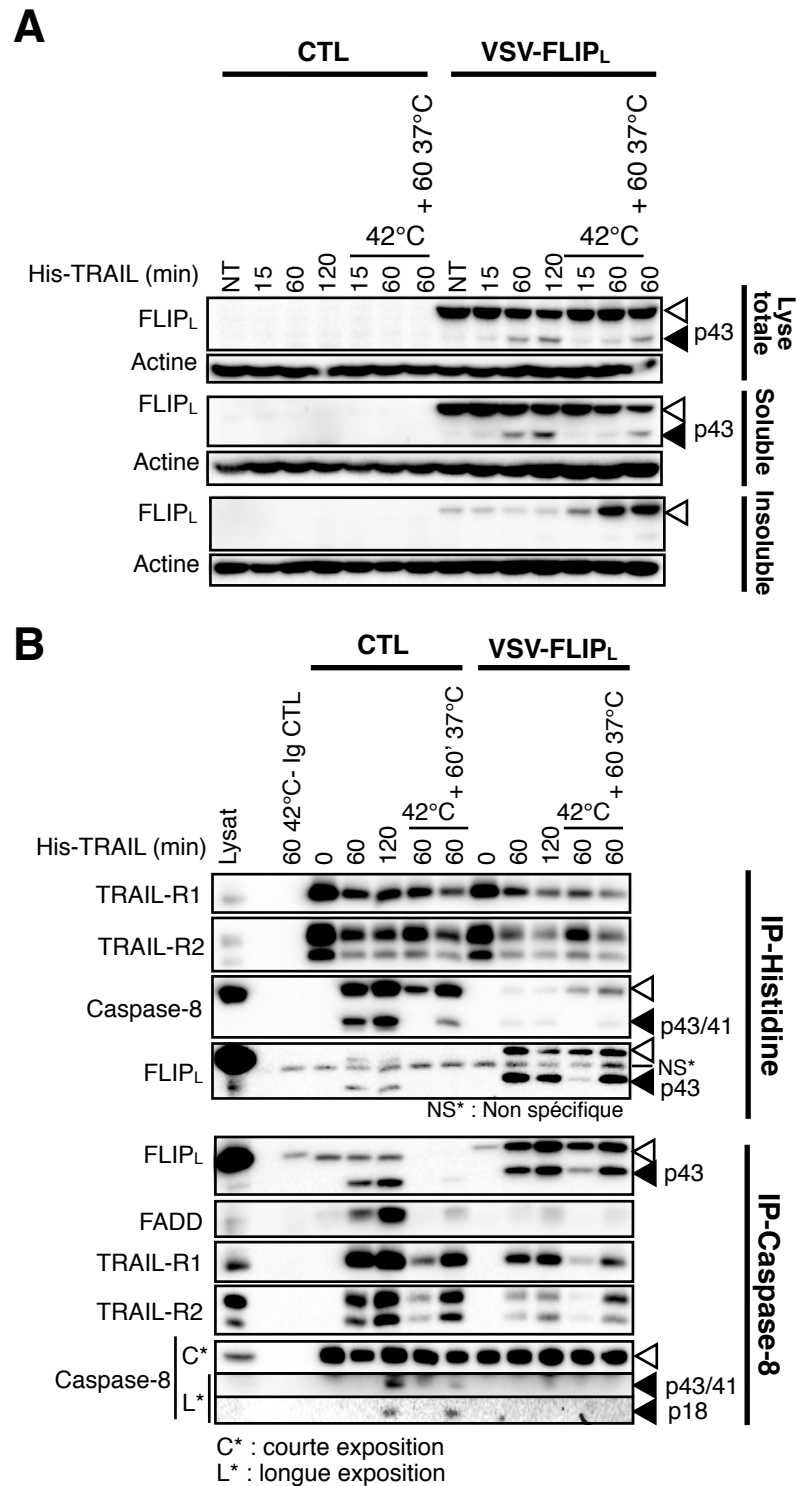


Figure 33. La sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie est dépendante de FLIP

A. Les MDA-MB-231 ont été infectées par des rétrovirus codant pour VSV-FLIP_L ou vides (CTL), puis les cellules ont été stimulées avec 500 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans choc thermique pour le temps d'incubation et aux températures indiquées. Les cellules ont été lysées totalement ou partiellement dans un tampon NP40 1% (voir matériel et méthode). Les fractions totales, solubles et insolubles ont été chargées séparément et les protéines ont été détectées par Western blot.

B. Les MDA-MB-231 utilisées précédemment ont été stimulées avec 500 ng/mL de His-TRAIL pour le temps d'incubation et aux températures indiquées. L'histidine ou la caspase-8 ont été immunoprécipitées (voir matériel et méthode), les protéines ont été détectées par Western blot.

A et B. Les flèches blanches indiquent les protéines natives, les flèches noires indiquent les fragments de clivage. Une expérience représentative est présentée. (n=3)

Comme attendu, la présence de glycérol restaure en presque totalité la protection des cellules vis à vis de TRAIL en conditions d'hyperthermie (figure 32C), ce qui confirme que l'agrégation de FLIP est l'événement majeur dans la sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie. La présence de FLIP dans le cytosol lui permet de se lier à nouveau à la caspase-8 et de retrouver sa fonction inhibitrice dans le DISC et sur la caspase-8 (figure 32D). Il est intéressant de noter que la restauration de FLIP inhibe peu le clivage de la caspase-8 en fragments p43 et p41 mais inhibe fortement son clivage en fragments p18.

5. L'expression ectopique de FLIP restaure sa présence dans le DISC

Les résultats précédents indiquent que l'agrégation de FLIP est responsable de la sensibilisation (figure 32) et que l'expression ectopique de FLIP à l'aide de vecteurs rétroviraux protège de l'apoptose induite par TRAIL avec ou sans choc thermique (figure 30 - page 110). Si cet effet protecteur est observé, cela indique que le FLIP ectopique, malgré un choc thermique, est capable d'inhiber l'activation de la caspase-8. Sa présence dans la fraction cytosolique ainsi que dans le DISC de TRAIL en condition d'hyperthermie a été confirmée par des lyses et par des immunoprécipitations.

L'infection rétrovirale induit une forte expression de FLIP_L dans les MDA-MB-231 par rapport au FLIP endogène (figure 33A). Celui-ci devient fortement insoluble avec un choc thermique, cependant la fraction soluble contient toujours une grande quantité de FLIP_L.

Au niveau du DISC ou sur la caspase-8, l'expression ectopique de FLIP_L permet son recrutement en grande quantité malgré un choc thermique (figure 33B), ce qui a pour effet d'inhiber le recrutement et l'activation de la caspase-8. Par ailleurs et de manière surprenante, l'immunoprécipitation de la caspase-8 révèle que l'expression ectopique de FLIP diminue l'interaction entre FADD et la caspase-8, laissant un questionnement sur la dépendance à FADD de l'interaction entre FLIP et la caspase-8. Ces résultats confirment que maintenir la présence de FLIP dans le DISC et sur la caspase-8 en condition d'hyperthermie est suffisant pour bloquer efficacement l'apoptose induite par TRAIL.

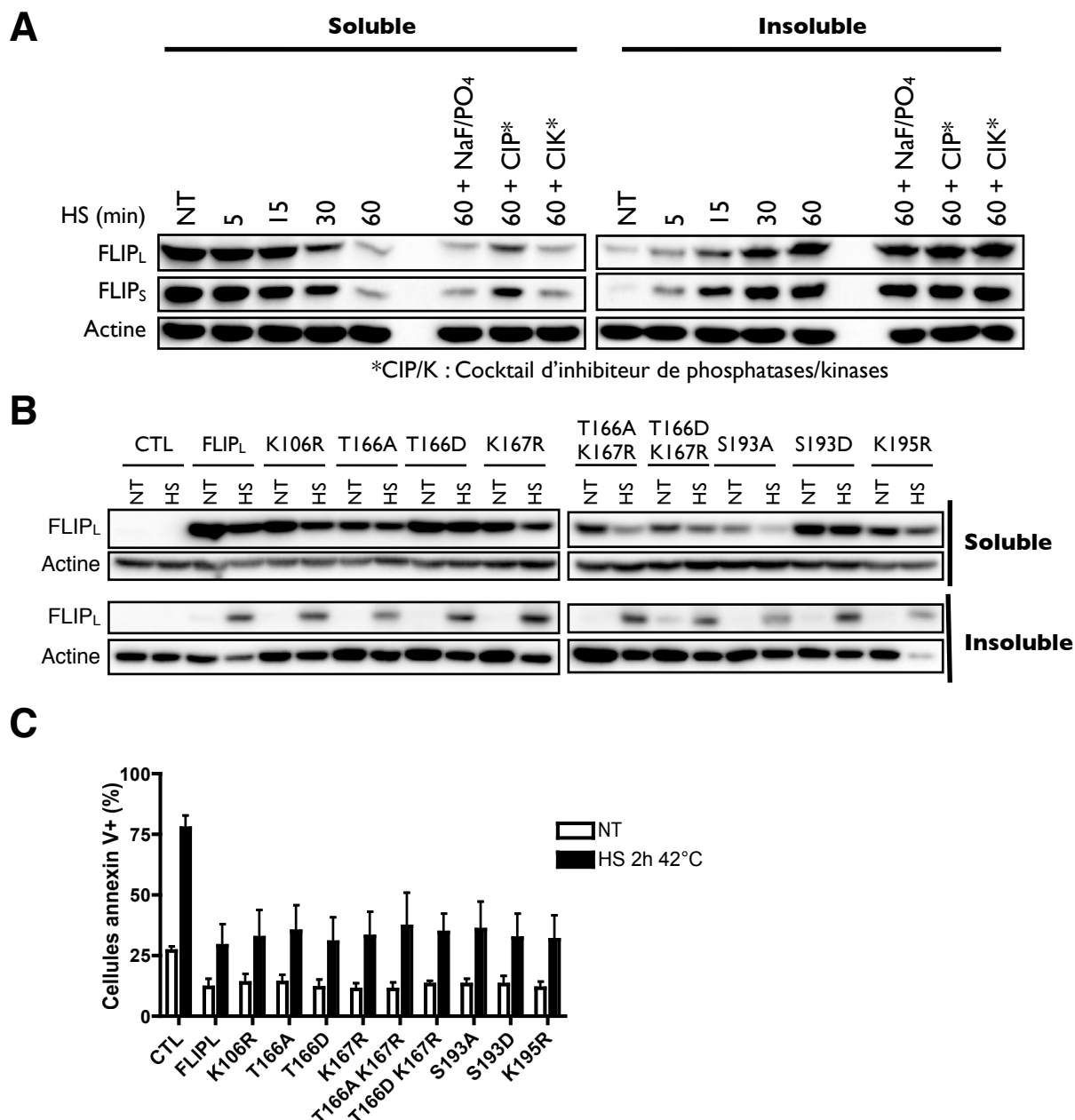


Figure 34. La précipitation de FLIP ne dépend pas d'une modification post-traductionnelle connue

A. Des lysats en tampon NP-40 1%, issues de cellules MDA-MB-231 ont subi un choc thermique le temps indiqué entre 5 et 60 min, en présence ou non des inhibiteurs de kinases le NaF et de phosphatases le NaPO₄, ou d'un cocktail commercial d'inhibiteur de phosphatase (CIP) ou de kinase (CIK). Les fractions solubles et insolubles ont été isolées par centrifugation (voir matériel et méthode) et les protéines ont été détectées par western blot. Une expérience représentative est présentée. (n=3)

B. Les MDA-MB-231 ont été infectées par des rétrovirus codant pour FLIP_L, des mutants de FLIP_L ou des rétrovirus vides (CTL). Puis, les cellules ont subi un choc thermique, les protéines des fractions solubles et insolubles ont été chargées séparément et détectées par western blot. (n=1)

C. Les cellules utilisées précédemment ont été traitées par 500 ng/mL de His-TRAIL, avec ou sans un choc thermique de 2h à 42°C. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

6. L'agrégation de FLIP ne dépend pas d'une modification post-traductionnelle connue

Dans le but de rechercher quels facteurs pourraient être déterminants dans l'agrégation de FLIP, l'éventuelle implication de modifications post-traductionnelles que pourrait subir cette protéine a été évaluée. La phosphorylation de FLIP pourrait contraindre la protéine, par des effets de charge, à un changement de conformation plus instable ce qui pourrait favoriser son agrégation. En ce sens, FLIP subit des modifications et peut être dégradé par divers stimuli tels que le TNF α (Chang *et al.*, 2006) ou par les dérivés réactifs de l'oxygène (Wilkie-Grantham et Matsuzawa, 2013). Dans ces conditions, la dégradation de FLIP peut être dépendante de sa phosphorylation. De plus, la Thréonine 166 et la Sérine 193 ont été identifiées comme sites de phosphorylation de JNK et de la PKC, qui sont deux kinases activées au cours de l'hyperthermie et impliquées dans la réponse cellulaire au choc thermique (Park et Liu, 2001; Meldrum *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004). Par ailleurs, les lysines 106, 167 et 195 de FLIP ont été identifiées comme des sites avérés ou potentiels d'ubiquitination (Song *et al.*, 2013a; Wilkie-Grantham et Matsuzawa, 2013). Afin d'exclure la possibilité que l'agrégation de FLIP au cours d'un choc thermique implique une modification, des inhibiteurs spécifiques ont été utilisés et des mutants de FLIP_L ont été développés.

Certains inhibiteurs, dirigés contre les phosphatases ou les kinases et qui ont été utilisés, ne sont pas perméables à la membrane des cellules et ne sont fonctionnels qu'en lysats cellulaires. Afin de s'assurer de l'efficacité de ces molécules, celles-ci ont été utilisées dans des lysats. L'agrégation de FLIP sous l'effet de la chaleur se fait de manière comparable que ce soit au sein de cellules vivantes (figure 31B - page 112) ou dans un lysat cellulaires en tampon NP-40 1% (figure 34A). Lorsque les lysats sont traités thermiquement en présence des inhibiteurs de kinases et de phosphatases NaF et PO₄ ou d'un cocktail commercial d'inhibiteurs de kinases (CKI), aucune différence n'est notée dans l'insolubilisation de FLIP (figure 34A). Cependant, la présence d'un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (CIP) induit une légère protection de FLIP dans la fraction soluble. Cela indique que soit la présence d'une phosphorylation sur FLIP serait inhibitrice, soit la phosphorylation d'une ou plusieurs protéines présentes, telle qu'une HSP, pourrait protéger FLIP de l'agrégation. De manière intéressante, la phosphorylation de FLIP sur la thréonine 193, via les PKC, a été décrite pour protéger FLIP de la dégradation protéasomale (Kaunisto *et al.*, 2009) et un choc thermique induit l'activation des PKC (Di

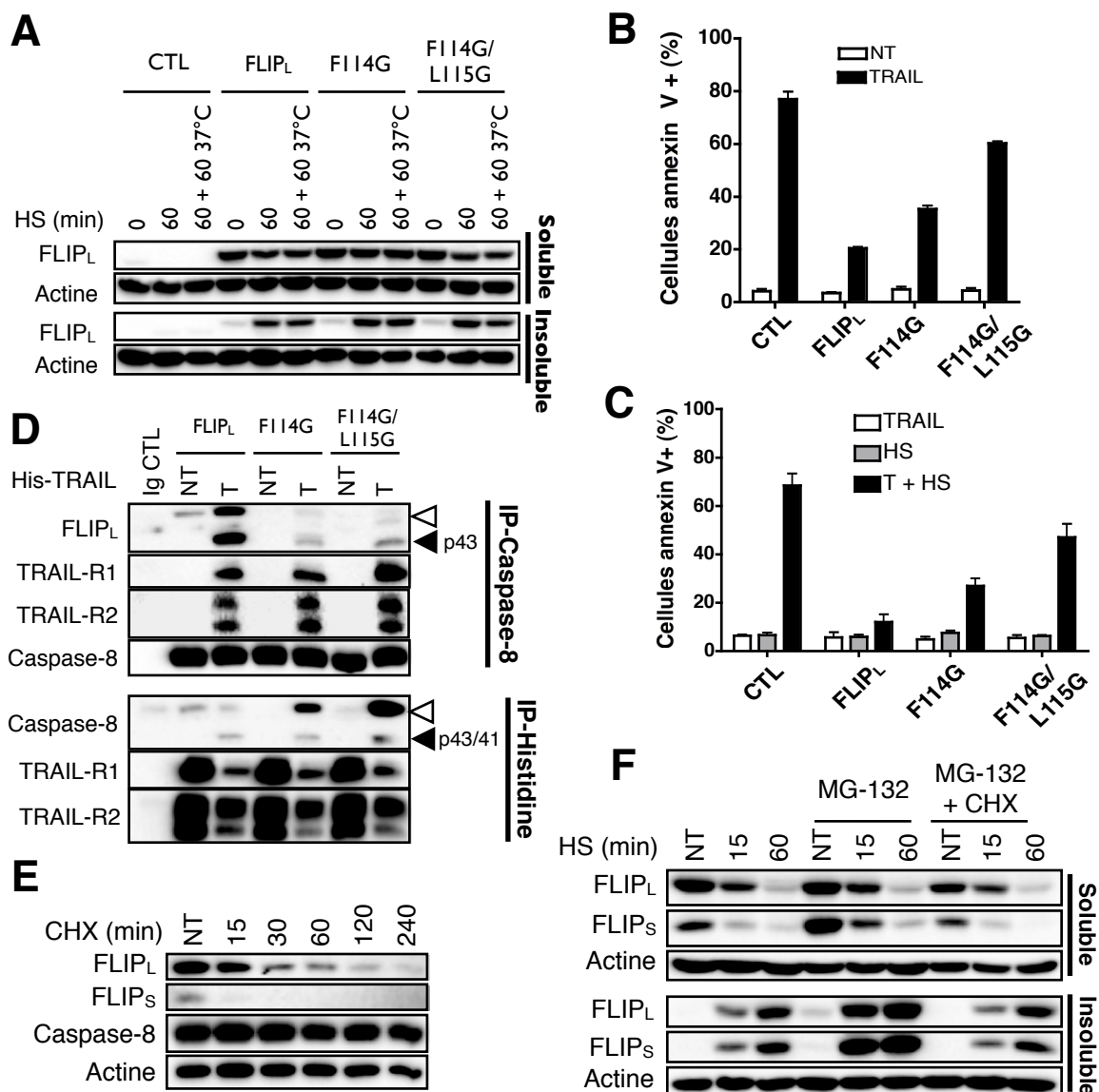


Figure 35. La précipitation de FLIP n'est pas dépendante de la boucle FL en position 114 ni de la dégradation protéasomale ou de la synthèse *de novo*

A. Les MDA-MB-231 ont été infectées par des rétrovirus codant pour FLIP_L, des mutants de FLIP_L de la boucle FL ou des rétrovirus vides (CTL). Puis, les cellules ont subi ou non un choc thermique de 60' avec ou non un temps de récupération de 60' à 37°C. Les cellules ont été lysées et les protéines des fractions solubles et insolubles ont été et détectées par western blot.

B. Les cellules utilisées précédemment ont été traitées par 2 µg/mL de His-TRAIL pendant 8h. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux.

C. Les cellules utilisées précédemment ont été traitées par 50 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans choc thermique conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux.

D. Les populations de MDA-MB-231 utilisées précédemment on été traitées (T) ou non (NT) par 500 ng/mL de His-TRAIL. Puis les cellules ont été lysées, la caspase-8 ou le ligand ont été immunoprécipités (voir matériel et méthode) et les protéines ont été détectées par western blot. (n=1)

E. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées avec l'inhibiteur de la traduction le cycloheximide (CHX) le temps indiqué de 15 à 240 minutes. Les cellules ont été lysées partiellement et les protéines ont été détectées par western blot. (n=1)

F. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées ou non pendant 1h avec l'inhibiteur du protéasome le MG-132 et avec ou non l'inhibiteur de la traduction le cycloheximide (CHX), puis elles ont subi un choc thermique le temps indiqué. Les cellules ont été lysées partiellement et les protéines des fractions solubles et insolubles ont été et détectées par western blot.

B et C. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

A et F. Une expérience représentative est présentée. (n=3)

et al., 1997). Cette hypothèse pourrait donc expliquer la légère protection observée suite à l'inhibition des phosphatases (figure 34A).

Pour approfondir cette question, différents mutants de phosphorylation et d'ubiquitination sur les sites connus ou prédits et précédemment cités, ont été construits par mutagenèse dirigée. Les mutants ne sont pas tous exprimés au même niveau, cependant ils deviennent tous insolubles de manière relativement uniforme à la suite d'un choc thermique, y compris le mutant T193D simulant une phosphorylation (figure 34B). Inversement, le mutant non phosphorylable T193A ne semble pas plus sensible à l'agrégation induite par un choc thermique. La modification des sites testés n'est donc à priori pas un critère déterminant pour l'agrégation de FLIP_L. Les différentes mutations de FLIP n'affectent pas leur fonctionnalité, tous les mutants sont capables d'inhiber l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique (figure 34C). Ces résultats indiquent que la phosphorylation d'une ou plusieurs tierces protéines, comme des protéines de la famille des HSP, pourrait protéger FLIP de l'agrégation.

7. L'agrégation de FLIP n'est pas dépendante de la boucle FL en position 114 ni de la dégradation protéasomale ou de la synthèse de novo

Dans le but de comprendre la sensibilité particulière de FLIP à l'hyperthermie, le rôle de certaines caractéristiques de FLIP a été étudié. Si la sensibilité de FLIP est due à une particularité structurale précise, comme les deux isoformes FLIP_{L/S} s'agrègent, cette particularité pourrait se situer dans les domaines DED car il sont communs à toutes les isoformes (figure 9 - page 44). L'équipe de MacFarlane a présenté des résultats montrant que l'expression des domaines DED1 et DED2 de la caspase-8 couplés à la GFP induit la formation de filaments protéiques de plusieurs micromètres semblables à des fibrilles formées lors d'une agrégation protéique (Dickens *et al.*, 2012). Cette étude montre qu'un motif FL présent dans une poche du DED2 en position 122 et 123 est nécessaire à la formation de ces filaments. Une boucle FL semblable existe dans le DED2 de FLIP en position 114. La possibilité que cette boucle soit impliquée dans le mécanisme d'agrégation de FLIP a été évaluée par l'expression de mutants.

Le simple mutant F114G et le double mutant F114G/L115G de FLIP_L ont tous les deux la capacité de s'agréger sous l'effet de la température (figure 35A). En effet, le FLIP_L

sauvage et ses mutants sont présents uniformément dans la fraction insoluble après un choc thermique. La stabilité des agrégats après 1h d'incubation supplémentaire à 37°C semble également identique. La boucle FL de FLIP en position 114 ne semble donc pas impliquée dans l'instabilité de FLIP en condition d'hyperthermie. Néanmoins, cette boucle semble avoir un rôle fonctionnel important. En effet, l'expression du double mutant F114G/L115G et en moindre mesure du simple mutant, bloque moins et peu l'apoptose induite par une forte concentration de TRAIL (2 µg/mL) en comparaison à l'expression du FLIP_L sauvage (figure 35B). La même observation est faite lors d'un traitement par TRAIL et par un choc thermique (figure 35C). Cette perte de fonction de protection peut être expliquée par un défaut de recrutement sur la caspase-8 comme le montrent les analyses du DISC obtenues par des expériences d'immunoprécipitation (figure 35D).

FLIP est une protéine très instable qui a une durée de vie très courte, cette protéine est donc en perpétuel renouvellement dans les cellules. L'inhibiteur de la traduction, le cycloheximide (CHX), induit une perte conséquente de FLIP dès 30 minutes de traitement (figure 35E). Or, les protéines nouvellement synthétisées ou en cours de synthèse n'ont pas une conformation stable et sont plus susceptibles de former des agrégats insolubles que les protéines sous leur conformation native (Baler *et al.*, 1992; Vabulas *et al.*, 2010). Comme l'ensemble du FLIP est renouvelé toutes les trente minutes, soit moins de temps que la durée d'un choc thermique, sa demi-vie exceptionnellement courte pourrait expliquer sa sensibilité particulière à l'hyperthermie. Pour évaluer cette hypothèse, un blocage simultané de la synthèse *de novo* et de la dégradation par le cycloheximide et l'inhibiteur du protéasome, le MG-132, a été effectué. Les inhibiteurs ont été ajoutés 1h avant un choc thermique, de manière à exposer à la température que des protéines pleinement synthétisées et repliées. Néanmoins, la combinaison des inhibiteurs n'affecte pas l'insolubilisation de FLIP (figure 35F). Cela suggère que la sensibilité de FLIP au choc thermique serait due à sa structure intrinsèque et non au renouvellement perpétuel de cette protéine. Par ailleurs, le blocage du protéasome seul n'affecte pas non plus la solubilité de FLIP au cours d'un choc thermique (figure 35F), ce qui confirme que la disparition de FLIP de la fraction cytosolique n'est pas liée à sa dégradation.

Conclusion intermédiaire

Pour résumer cette deuxième partie, un choc thermique sensibilise les cellules cancéreuses à l'apoptose induite par TRAIL en provoquant l'agrégation des isoformes L et S de FLIP. L'agrégation de FLIP est nécessaire et suffisante à cette sensibilisation, ce mécanisme est général et a été observé dans les cinq lignées testées.

L'agrégation de FLIP n'est dépendante ni d'une modification post-traductionnelle connue, ni de la boucle FL en position 114 ou de la synthèse *de novo*. Néanmoins, il semblerait que la phosphorylation de certaines protéines puisse inhiber l'agrégation de FLIP au cours d'un choc thermique.

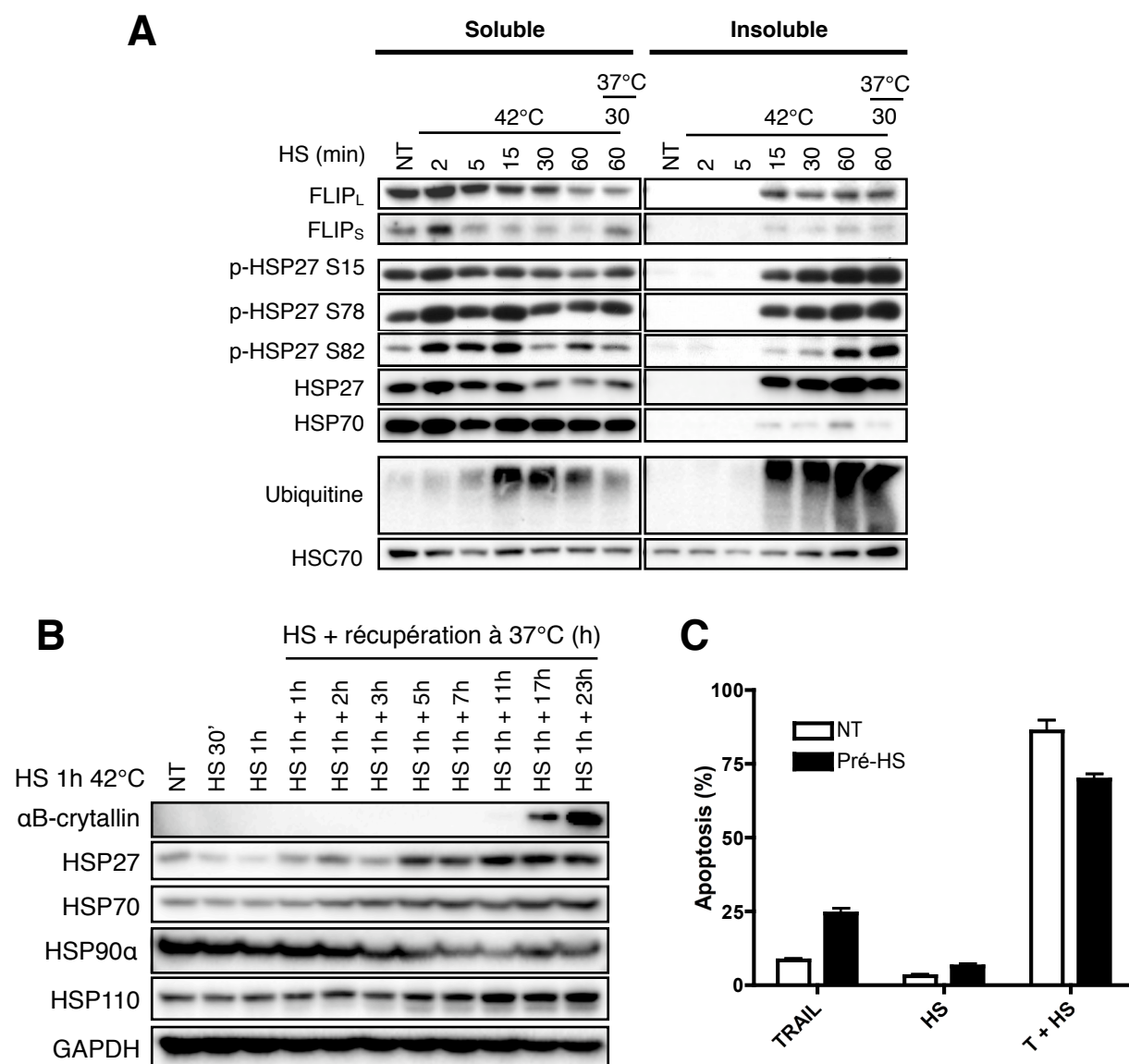


Figure 36. L'insolubilisation de FLIP est associée à celle d'HSP27 et d'ubiquitine

A. Les cellules MDA-MB-231 ont subi un choc thermique le temps et aux températures indiquées. Les cellules ont été lysées partiellement dans un tampon NP-40 1% (voir matériel et méthode), les fractions solubles et insolubles ont été chargées et les protéines ont été détectées par western blot. (n=1)

B. Les cellules MDA-MB-231 ont subi un choc thermique de 30 minutes ou de 1h à 42°C avec un temps de récupération à 37°C indiqué, puis elles ont été lysées en NP40 1%. Les protéines ont été détectées par western blot. (n=1)

C. Les cellules MDA-MB-231 ont subi ou non un choc thermique de 1h 42°C (Pré-HS). Après 24h de récupération, les cellules ont été traitées par 50 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans un choc thermique en accord avec la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par comptages après coloration au Hoechst. Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre différentes mesures d'une même expérience. (n=1)

III. Les protéines de choc thermique ont un rôle mineur dans l'agrégation de FLIP et dans l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique

1. L'insolubilisation de FLIP est associée à la présence d'HSP27 et de l'ubiquitine.

L'agrégation de FLIP, comme toute agrégation protéique, est un phénomène lié au système d'ubiquitination et de dégradation des protéines ainsi qu'à l'activité des protéines de la famille des HSP (Vabulas *et al.*, 2010). HSP27 est un inhibiteur important de la formation d'agrégats protéiques (Ehrnsperger *et al.*, 1997). Aussi, sa phosphorylation est un paramètre important de sa fonction biologique (Rogalla *et al.*, 1999).

HSP27 devient insoluble à des temps et dans des proportions comparables à FLIP, ce qui par ailleurs n'est pas le cas d'HSP70 (figure 36A). Les formes insolubles d'HSP27 sont également phosphorylées sur les sérines 15, 78 et 82. De plus, à la suite d'un choc thermique la présence de formes dégradées caractéristiques d'une poly-ubiquitination est visible, en particulier dans la fraction insoluble. Cela pourrait indiquer que des protéines dénaturées par le choc thermique sont ubiquitinylées en vue d'une dégradation mais qu'une partie d'entre elle s'agrége et devient insoluble. En ce sens, la quantité de protéines ubiquitinylées dans la fraction soluble diminue à partir de 30 minutes, ce qui laisse penser que les protéines sont ubiquitinylées avant de devenir insolubles ou que les protéines restées solubles sont rapidement dégradées par le protéasome. Il est intéressant de noter que les observations faites jusqu'à présent sont compatibles avec les observations faites sur la formation d'agrésomes. Un agrésome est une entité constituée de protéines agrégées et ubiquitinylées, ainsi que de chaperon (figure 20 - page 76) dont HSP27 (Johnston *et al.*, 1998; Bolhuis et Richter-Landsberg, 2010).

L'exposition des cellules cancéreuses MDA-MB-231 à un choc thermique de 1h à 42°C induit l'expression des HSP à divers temps après le choc (figure 36B). HSP70 est la première à être surexprimée après 2h de récupération, suivie d'HSP27, d'HSP110 et de l' α B-crystallin. Dans le but d'évaluer l'importance des HSP dans la combinaison de TRAIL et d'une hyperthermie, un traitement a été fait 24h après un premier choc thermique, au moment où toutes les HSP sont surexprimées. La sensibilisation à TRAIL induite par

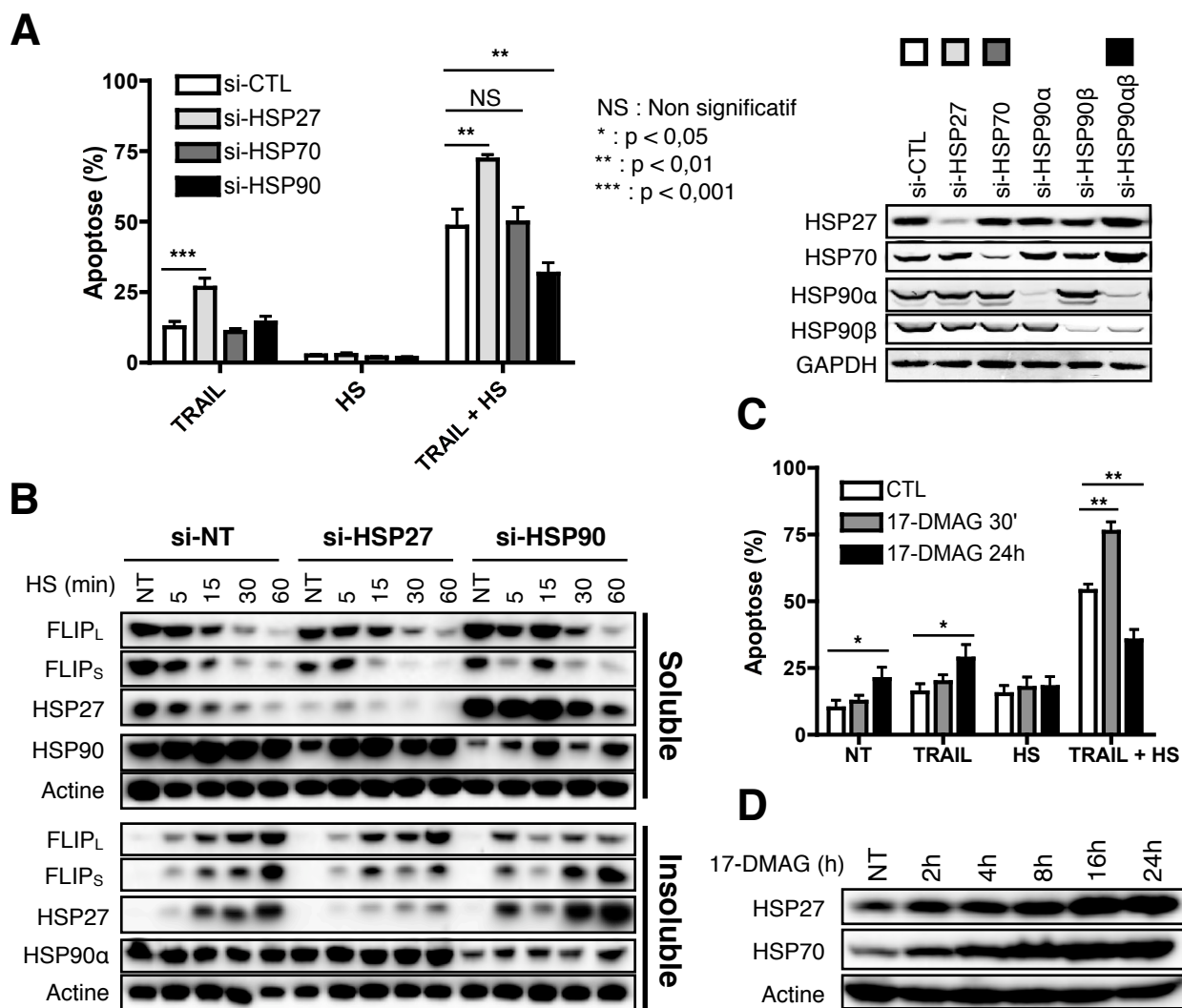


Figure 37. HSP27, HSP70 et HSP90 impactent différemment la synergie entre TRAIL et l'hyperthermie.

A. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des *siRNA* contrôles ou dirigés contre HSP27, HSP70 ou HSP90 puis traitées avec 50 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans choc thermique conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux. Les niveaux d'expression des HSP ont été contrôlés par western blot.

B. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des *siRNA* contrôles ou dirigés contre HSP27 ou les isoformes α et β d'HSP90. Les cellules ont subi un choc thermique le temps indiqué puis, elles ont été lysées en NP40 1%. Les fractions solubles et insolubles ont été chargées séparément et les protéines ont été détectées par western blot. (n=1)

C. Les cellules MDA-MB-231 ont été pré-traitées ou non (CTL) avec l'inhibiteur d'HSP90 le 17-DMAG pendant 30 minutes ou 24 h, puis elles ont été traitées ou non (NT) avec 50 ng/mL de His-TRAIL avec (TRAIL + HS) ou sans choc (TRAIL) thermique conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux.

D. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées avec l'inhibiteur d'HSP90 le 17-DMAG le temps indiqué puis lysées en NP40 1%. Les protéines ont été détectées par western blot. (n=1)

A et C. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

l'hyperthermie est légèrement diminuée dans les cellules ayant subi un précédent choc thermique (figure 36C). Ces résultats indiquent que les HSP, et particulièrement HSP27 qui devient insoluble avec FLIP, pourraient modifier les mécanismes d'apoptose ou de sensibilisation par une hyperthermie et influencer ainsi l'efficacité de la combinaison.

2. HSP27 , HSP70 et HSP90 impactent différemment la synergie entre TRAIL et l'hyperthermie

Dans le but d'approfondir le rôle des protéines de choc thermique dans l'apoptose induite par la combinaison de TRAIL et d'une hyperthermie, trois HSP aux fonctions cellulaires majeures, HSP27, HSP70 et HSP90 ont été déplétées par des *siRNA*. Un inhibiteur spécifique d'HSP90 dérivé de la geldanamycine, le 17-DMAG, a également été utilisé (Rastelli *et al.*, 2005).

La déplétion d'HSP27 montre que cette protéine a un rôle clairement protecteur vis à vis de l'apoptose induite par TRAIL (figure 37A), ce qui a déjà été montré dans une lignée cancéreuse du poumon (Zhuang *et al.*, 2010). HSP27 protège aussi bien de l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique. La déplétion d'HSP70, dont le rôle protecteur vis à vis de TRAIL a été montré par plusieurs études (Zhuang *et al.*, 2013; Monma *et al.*, 2013), n'a pas d'effet avec ou sans choc thermique dans ce modèle. Enfin, contrairement à ce qui aurait pu être attendu, la déplétion des isoformes α et β d'HSP90 protège de l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique, indiquant de manière surprenante qu'HSP90 pourrait avoir une fonction pro-apoptotique dans ces conditions (figure 37A).

HSP27 et HSP90 sont deux HSP capables de réguler positivement ou négativement la synergie entre TRAIL et un choc thermique. Comme nos résultats indiquent que cette synergie est basée sur l'agrégation de FLIP, l'impact de la déplétion de ces HSP sur la solubilité de FLIP au cours d'une hyperthermie a été évaluée. Contrairement à ce qui aurait pu être attendu, la déplétion d'HSP27 n'augmente pas de manière visible l'insolubilisation de FLIP (figure 37B). La sensibilisation à l'apoptose observée avec la déplétion d'HSP27 (figure 37A) pourrait être due aux autres rôles anti-apoptotiques d'HSP27, comme sa capacité à inhiber la caspase-3 ou la caspase-9 (Garrido *et al.*, 1999; Rocchi *et al.*, 2006; Voss *et al.*, 2007). (AAA siHSP27 casp-9). Autre fait marquant, la

déplétion d'HSP90 semble ralentir l'insolubilisation de FLIP (figure 37B), ce qui est cohérent avec la protection observée face à la combinaison de TRAIL et d'une hyperthermie (figure 37A) mais pas vis à vis de son rôle de chaperon. L'inhibition prolongée d'HSP90 a des effets anti-apoptotiques comparables à sa déplétion par des *siRNA*. En effet, un pré-traitement par le 17-DMAG, lorsque celui-ci est fait sur 24h, protège les MDA-MB-231 de l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique (figure 37C). Cependant, en cohérence avec les rôles anti-apoptotiques attribués à HSP90 (Jego *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2012), son inhibition à court terme sur 30 minutes a l'effet inverse et sensibilise à l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique. La différence d'effet selon le temps de traitement au 17-DMAG pourrait être expliquée par le fait que l'inactivation prolongée d'HSP90, induit la déplétion de protéines influençant la voie de TRAIL, comme RIP1 (Kamal *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2012). Cependant, l'inactivation d'HSP90 induit également un stress cellulaire, ce qui provoque une réponse à ce stress par la surexpression d'autres chaperon (Taiyab *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013). L'inactivation d'HSP90, à la manière d'un choc thermique (figure 36B et C), induit la surexpression de grandes quantités d'autres HSP, dont HSP27 (figure 37B et D) et HSP70 (figure 37D). Cette compensation par la surexpression de multiples HSP pourrait donc expliquer la protection observée suite à l'inactivation d'HSP90. Par ailleurs, l'inhibition d'HSP90 par le 17-DMAG sensibilise à l'apoptose induite par TRAIL seul de manière significative (figure 37C), ce qui a déjà été démontré (Vasilevskaya et O'Dwyer, 2005). Cependant, dans ce modèle cette sensibilisation semble être due à la toxicité du 17-DMAG (figure 37C - NT).

Pour résumer, d'une part HSP27 protège de l'apoptose induite par TRAIL avec ou sans choc thermique, mais cette protection n'est à priori pas reliée à la stabilité de FLIP. D'autre part HSP90 protège également de l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique. Cependant, une déplétion ou une inhibition sur 24h a pour effet non pas une sensibilisation, mais une protection face à l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique, ce qui est associé à la surexpression des autres protéines de la famille des HSP.

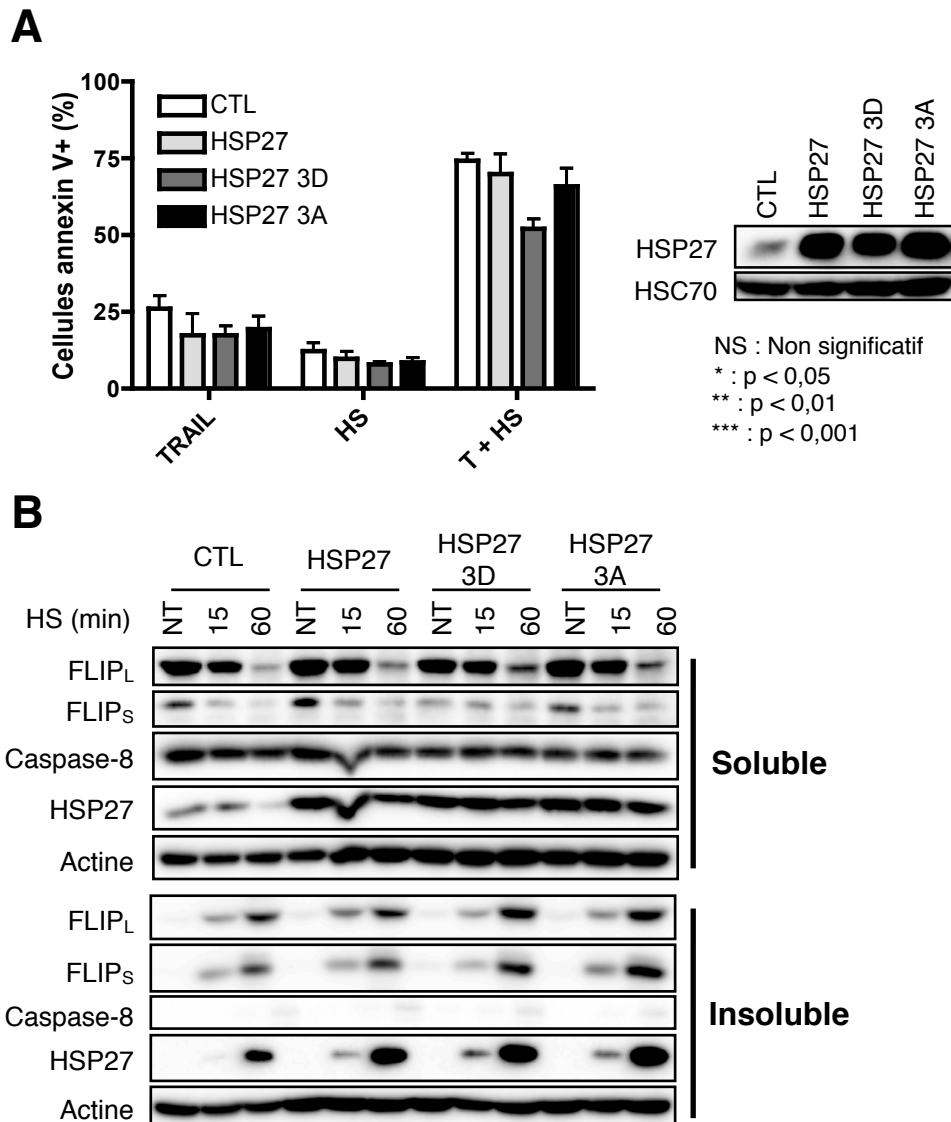


Figure 38. HSP27 n'affecte pas l'insolubilisation de FLIP

A. Les MDA-MB-231 ont été infectées par des rétrovirus codant pour HSP27, ses mutants de phosphorylation 3D et 3A ou des rétrovirus vides (CTL). Puis, les cellules ont été traitées avec 50 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans choc thermique conformément à la figure 1A. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie. Les niveaux d'expression d'HSP27 ont été contrôlés par Western blot. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

B. Les populations de MDA-MB-231 précédemment utilisées ont subi un choc thermique à 42°C pendant le temps indiqué et ont été lysées partiellement dans un tampon NP40 1% (voir matériel et méthode). Les fractions solubles et insolubles ont été chargées séparément et les protéines ont été détectées par Western blot. (n=1)

3. HSP27 n'inhibe pas l'insolubilisation de FLIP

Le rôle d'HSP27 en tant qu'inhibiteur de l'agrégation protéique n'est plus à démontrer. Le fait que sa déplétion sensibilise aux traitements mais ne modifie pas l'insolubilisation de FLIP est surprenant. De plus la déplétion d'HSP90 protège de la combinaison de TRAIL et de l'hyperthermie, ce qui est associé à la surexpression d'HSP27 et à l'inhibition de l'insolubilisation de FLIP. L'incapacité d'HSP27 à protéger FLIP de l'agrégation a donc été confirmée par son expression ectopique à l'aide de vecteurs rétroviraux.

L'expression d'HSP27 ou de son mutant 3A non phosphorylable, où les sérines 15, 78 et 82 ont été remplacées par des alanines, ne protège pas d'un traitement par TRAIL et par un choc thermique (figure 38A). Par contre, l'expression de son mutant phosphomimétique 3D, où les sérines ont été remplacées par des acides aspartiques, a un effet protecteur. Le fait que le mutant d'HSP27 3A, à la différence du 3D, n'ait pas d'effet laisse supposer que le ou les rôles anti-apoptotiques d'HSP27 nécessitent sa phosphorylation, ce qui est cohérent avec les travaux de Rogalla (Rogalla *et al.*, 1999). De plus, le manque d'effet sur l'apoptose de la surexpression d'HSP27 sauvage, à la différence du mutant 3D, pourrait s'expliquer par la saturation du mécanisme de phosphorylation d'HSP27. Ainsi, HSP27 pourrait être en excès par rapport à ses kinases, connues pour être dépendantes de la voie p38 MAPK (Stokoe *et al.*, 1992; Rouse *et al.*, 1994).

La surexpression d'HSP27, y compris de son mutant 3D, ne protège pas FLIP de l'insolubilisation au cours d'un choc thermique (figure 38B). Ces résultats, en accord avec ceux obtenus par la déplétion d'HSP27 à l'aide de *siRNA*, confirment qu'HSP27 n'est, à priori, pas directement impliquée dans le mécanisme d'agrégation de FLIP. La protection vis à vis de la combinaison de TRAIL et d'une hyperthermie, engendrée par la déplétion d'HSP90 n'est donc pas due spécifiquement à la surexpression d'HSP27 qui lui est associée. Un stress cellulaire, qu'il soit provoqué par un choc thermique ou l'inactivation prolongée d'HSP90, a pour effet d'une part de protéger les cellules de la combinaison de TRAIL et d'une hyperthermie et d'autre part de surexprimer l'ensemble des protéines de la famille des HSP. Comme les HSP sont connues par agir en étroite collaboration les unes

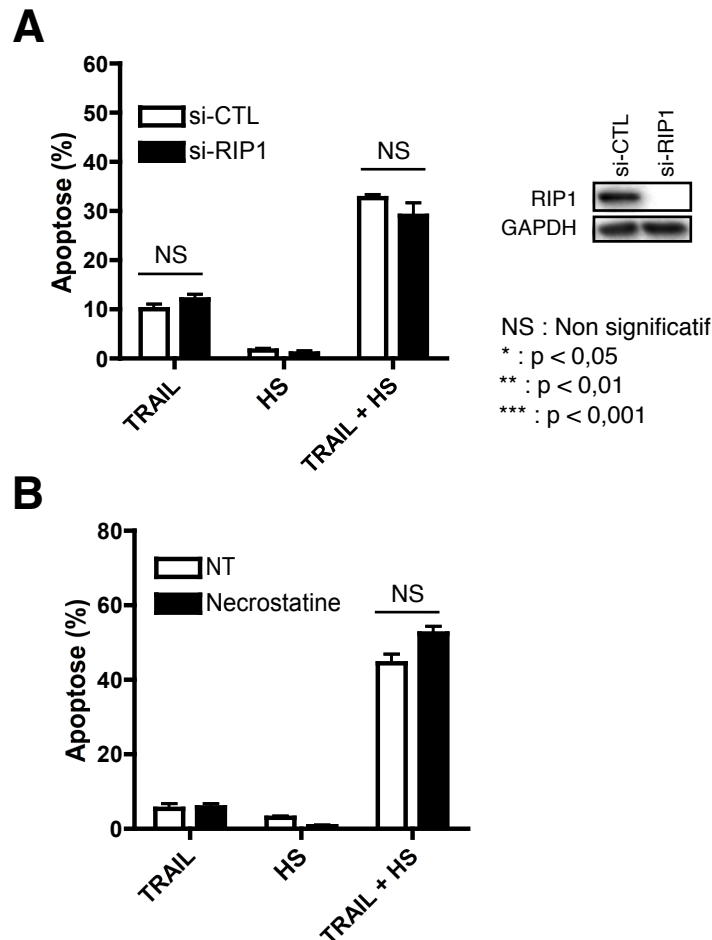


Figure 39. RIP1 n'est pas impliqué dans la sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie

A. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des *siRNA* contrôles ou dirigés contre RIP1 puis traitées avec 50 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans choc thermique conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux sur au moins 3 expériences indépendantes. Le niveau d'expression de RIP1 a été contrôlé par Western blot.

B. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 1h par 10 $\mu\text{g/mL}$ de l'inhibiteur de l'activité kinase de RIP1, la nécrostatine, puis elles ont été traitées avec 50 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans choc thermique conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par un comptage après une coloration des noyaux au Hoechst.

A et B. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

avec les autres (Patel *et al.*, 2005; Sreedharan *et al.*, 2011; Miot *et al.*, 2011; Genest *et al.*, 2013; Mattoo *et al.*, 2013; Arrigo, 2013), il serait possible que l'ensemble des HSP puisse réguler la précipitation de FLIP au cours d'une hyperthermie sans que cela soit possible pour une seule HSP en particulier.

4. *RIP1 n'est pas impliqué dans la sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie*

L'implication de RIP1 a été évaluée pour plusieurs raisons : dans ce modèle RIP1 est recruté dans le DISC de TRAIL ainsi que sur la caspase-8 et ces recrutements sont augmentés en condition d'hyperthermie (figure 27) ; RIP1 peut avoir un impact sur l'activation de la caspase-8 et l'apoptose induite par TRAIL (Feoktistova *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013) ; RIP1 possède une activité kinase qui pourrait être possiblement liée à la fonction ou la solubilité de FLIP (Wang *et al.*, 2007a) (figure 34A) ; cette protéine est une cliente d'HSP90 (Chen *et al.*, 2012) dont l'inhibition à long terme bloque la combinaison de TRAIL et de l'hyperthermie (figure 37A et C).

La déplétion de RIP1 par des *siRNA* n'induit pas de différence notable dans la sensibilité des cellules à TRAIL avec ou sans choc thermique (figure 39A). L'exposition des cellules à l'inhibiteur de l'activité kinase de RIP1, la nécrostatine, ne protège pas non plus de l'apoptose induite par TRAIL (figure 39B). Cependant, la nécrostatine permet une légère sensibilisation des cellules à un traitement par TRAIL et par un choc thermique mais trop faible pour être statistiquement significative. Cette légère différence de résultat entre l'approche par des *siRNA* ou par un inhibiteur pourrait être due à une adaptation des cellules à la déplétion de RIP1, à une non spécificité de l'inhibiteur à la concentration utilisée (10 µg/mL), ou encore à la présence d'une activité kinase de RIP1 même lorsque celle-ci est présente en faible quantité dans la cellule. Dans ce cas, l'activité kinase de RIP1 pourrait par exemple induire une voie de survie et contrer en partie le signal apoptotique par l'intermédiaire des MAPKinases (Azijli *et al.*, 2013). Néanmoins, ces résultats indiquent que RIP1 n'est pas positivement impliqué dans la synergie entre TRAIL et l'hyperthermie et que son rôle de protection, s'il existe est mineur dans ces conditions.

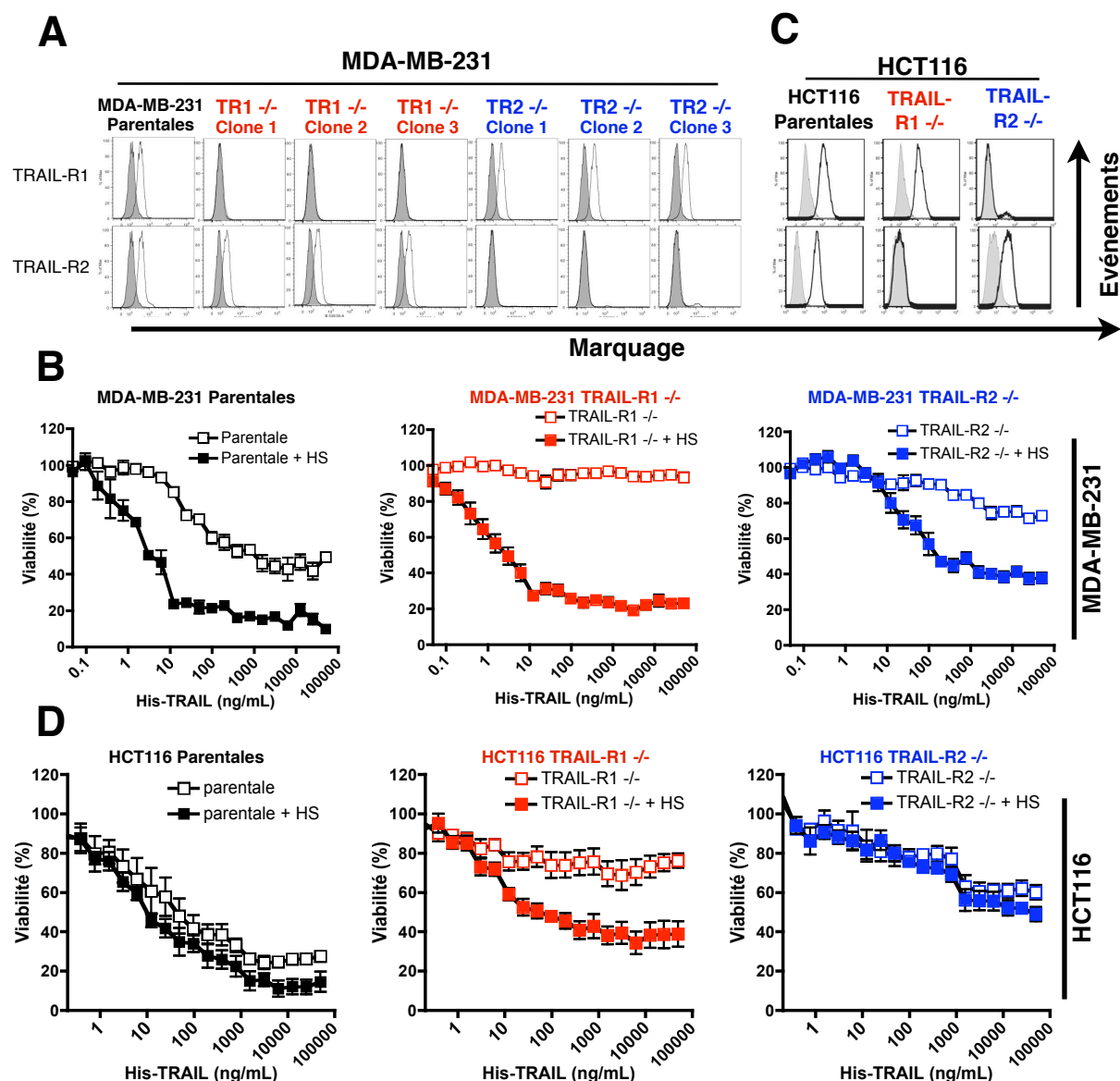


Figure 40. La sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie dépend principalement de TRAIL-R2

A. Les cellules MDA-MB-231 ont été inactivées pour les gènes des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 par la technologie TALEN (voir matériel et méthode). Trois clones des populations **TRAIL-R1 -/-**, représentés en rouge et **TRAIL-R2 -/-**, représentés en bleu ont été sélectionnés, l'expression membranaires des récepteurs à TRAIL-R1 et à TRAIL-R2 a été mesurée par immunomarquage et cytométrie en flux. Le pic blanc représente le marquage spécifique, le pic gris représente le marquage de l'isotype contrôle.

B. Les clones précédents ont été traités avec des doses croissantes de TRAIL pendant 16h avec la première heure à 42°C (carrés pleins) ou non (carrés vides). Les cellules adhérentes ont été colorées par du bleu de méthylène, l'absorbance a été mesurée et la moyenne a été faite entre les clones.

C. Les cellules HCT116 ont été inactivées pour les gènes des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 par la technologie TALEN (voir matériel et méthode). Des populations TRAIL-R1 -/- et TRAIL-R2 -/- ont été isolées à l'aide d'un trieur de cellules (voir matériel et méthode) et l'absence des récepteurs a été contrôlé comme précédemment par cytométrie en flux. Le pic blanc représente le marquage spécifique, le pic gris représente le marquage de l'isotype contrôle.

D. Les populations de HCT116 précédemment utilisées ont été traitées avec des doses croissantes de TRAIL et analysées comme en B.

B. et D. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences représentatives

IV. TRAIL-R1 et TRAIL-R2 sont différenciellement impliqués dans l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique

1. La sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie dépend principalement de TRAIL-R2

Certains éléments indiquent que l'hyperthermie pourrait affecter différemment l'apoptose induite par le récepteur TRAIL-R1 ou par le récepteur TRAIL-R2. La purification des radeaux lipidiques a révélé que les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 ne se localisent pas dans les mêmes fractions membranaires (figure 28A). Également, FLIP et la caspase-8 pourraient être recrutés différemment sur TRAIL-R1 et sur TRAIL-R2. En ce sens, une étude a montré que la sensibilisation à TRAIL par l'inhibition d'une transférase, impliquée dans des modifications post-traductionnelles des protéines de la famille de Ras, se fait via la déplétion de FLIP et que cette sensibilisation est dépendante de la présence de TRAIL-R2 mais pas de TRAIL-R1 (Chen *et al.*, 2010).

Pour étudier l'apoptose induite par TRAIL par l'intermédiaire de l'un ou l'autre de ses récepteurs agonistes, l'expression des gènes codant pour ces récepteurs a été inactivée par la technologie TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*) (Gaj *et al.*, 2013). Le principe consiste à produire une protéine de fusion contenant un domaine de coupure à l'ADN (activité *DNase*) à un domaine de liaison à l'ADN de type "TALE", spécifique d'une séquence donnée (Boch *et al.*, 2009). Les plasmides codant pour les protéines de fusion ont été développés par l'entreprise Collectis TALEN™. Par une simple transfection des mutations (insertion/délétion) ont été induites et ont mené dans environ 5% des cas à une inactivation de l'expression de TRAIL-R1 ou de TRAIL-R2.

Partant de populations de cellules MDA-MB-231 transfectées et donc hétérogènes pour l'expression de TRAIL-R1 ou de TRAIL-R2, des clones ont été isolés et l'expression membranaire des récepteurs par rapport à la lignée parentale a été évaluée. Trois clones déficients pour TRAIL-R1 et trois clones déficients pour TRAIL-R2 ont ainsi été sélectionnés (figure 40A). La viabilité de ces différents clones, suite à des traitements par des doses croissantes de TRAIL avec ou sans choc thermique, a été évaluée par une coloration au bleu de méthylène des cellules viables après 16h de traitement. La moyenne

de la viabilité cellulaire a été faite sur les 3 clones et sur au moins 3 expériences indépendantes (figure 40B). Pour l'apoptose induite par TRAIL sans choc thermique (représentée par des carrés vides), la perte d'expression du récepteur TRAIL-R1 (en rouge) protège entièrement les MDA-MB-231 tandis que la perte de l'expression du récepteur TRAIL-R2 (en bleu) protège seulement partiellement. Dans ce modèle, TRAIL-R1 est donc nécessaire à l'apoptose induite par TRAIL tandis que TRAIL-R2 est utile mais accessoire. Cependant, lorsqu'un choc thermique de 1h à 42°C est ajouté (carrés pleins), les clones déficients en TRAIL-R1 et résistants, deviennent très sensibles à l'apoptose et à de très faibles doses de TRAIL. Inversement, en l'absence de TRAIL-R2 les clones sont faiblement sensibilisés à TRAIL par un choc thermique (figure 40B). Ces résultats indiquent que l'apoptose induite par TRAIL est majoritairement dépendante de TRAIL-R1 alors que l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique est majoritairement dépendante de TRAIL-R2.

Des résultats similaires ont été obtenus dans la lignée de carcinome de colon HCT116. Dans ce modèle, des populations cellulaires négatives pour le récepteur TRAIL-R1 ou pour le récepteur TRAIL-R2 ont été isolées par un tri cellulaire en cytométrie en flux. L'expression membranaire des récepteurs à TRAIL au sein de ces populations a été contrôlée (figure 40C). Comme pour la lignée MDA-MB-231, l'apoptose induite par TRAIL (carrés vides) est plus affectée par la perte de TRAIL-R1 que par la perte de TRAIL-R2 (figure 40D). Alors qu'en l'absence de TRAIL-R1 la viabilité passe de 80% sans, à 40% avec un choc thermique (carrés pleins), en l'absence de TRAIL-R2 un choc thermique ne sensibilise pas ou peu à l'apoptose induite par TRAIL.

2. La caspase-8 est différenciellement activée sur TRAIL-R1 ou sur TRAIL-R2

Le fait que les clones déficients pour TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 répondent différemment au choc thermique pourrait être expliqué par une sélectivité de FLIP pour TRAIL-R2. Pour vérifier cette hypothèse, le ligand ou la caspase-8 ont été immunoprécipité dans la lignée parentale MDA-MB-231 ou dans les clones 1 déficients pour TRAIL-R1 ou pour TRAIL-R2 suite à un traitement par TRAIL et par un choc thermique.

Nos résultats indiquent que FLIP_L peut être recruté via TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 (figure 40A). Par contre, en cohérence avec les expériences de viabilité, la caspase-8 est recrutée en plus grande quantité sur TRAIL-R1, dans les cellules déficientes pour TRAIL-R2, que sur le TRAIL-R2. Également, l'activation de la caspase-8 dans le DISC est plus importante pour le clone déficient pour TRAIL-R2 que pour le clone déficient pour TRAIL-R1 en l'absence d'un choc thermique, confirmant ainsi l'importance de TRAIL-R1 dans la voie apoptotique de TRAIL. Lorsque les cellules subissent un choc thermique, FLIP n'est plus présent dans le DISC et ce indépendamment de la présence des récepteurs à TRAIL.

L'immunoprécipitation de la caspase-8 confirme qu'un choc thermique élimine la présence de FLIP indépendamment du récepteur présent (figure 41B). Les fragments de clivage de la caspase-8, particulièrement le fragment actif p18, est détecté après un choc thermique pour le clone déficient en TRAIL-R1 mais pas pour le clone déficient en TRAIL-R2 (figure 41B), alors que la quantité de caspase-8 recrutée dans le DISC est supérieure (figure 41A). Par ailleurs, l'absence de TRAIL-R1 inhibe le recrutement de la caspase-8 sur TRAIL-R2 alors que l'absence de TRAIL-R2 ne semble pas inhiber le recrutement de la caspase-8 sur TRAIL-R1 (figure 41B).

L'interprétation de ces résultats peut être faite de la manière suivante :

- En cas d'absence de TRAIL-R1 : la fixation de la caspase-8 sur TRAIL-R2 est diminuée et la présence de FLIP bloque le peu de caspase-8 présent, l'apoptose est donc bloquée. Un choc thermique permet l'absence de FLIP, le recrutement et l'activation de la caspase-8 en son fragment p18 sans que les fragments de clivage p43/p41 ne soient détectés dans le DISC. Ce qui indiquerait que le DISC formé est très efficace et que la caspase-8 est rapidement clivée et relarguée dans le cytosol sous son fragment p18. Dans ces conditions l'apoptose est importante.
- En cas d'absence de TRAIL-R2 : le recrutement de la caspase-8 est important et FLIP permet son activation en p43/p41 mais limite le relarguage de la p18. Dans ces conditions l'apoptose est faible. Un choc thermique permet en l'absence de FLIP, un fort recrutement de la caspase-8 mais celle-ci n'est pas activée ni en p43/p41, ni en p18. Cela pourrait indiquer que FLIP est nécessaire au clivage de la caspase-8 lorsque celle-ci est recrutée sur le TRAIL-R1 mais pas lorsqu'elle est recrutée sur le TRAIL-R2. Un

rôle similaire de FLIP dans le clivage en fragments p43/p41 de la caspase-8 a été décrit lorsque celle-ci est recrutée sur le récepteur FasR (Micheau *et al.*, 2002).

En conclusion, FLIP peut être recruté sur les deux récepteurs agonistes de TRAIL, cependant il semble nécessaire à l'activation de la caspase-8 lorsque celle-ci est recrutée dans un DISC via TRAIL-R1 alors que la caspase-8 peut être efficacement activée sans FLIP dans un DISC via TRAIL-R2. Ces résultats ont besoin d'être approfondis et confirmés, notamment dans d'autres lignées cellulaires, néanmoins ils pourraient indiquer une différence de mécanisme surprenante entre les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2.

Discussion

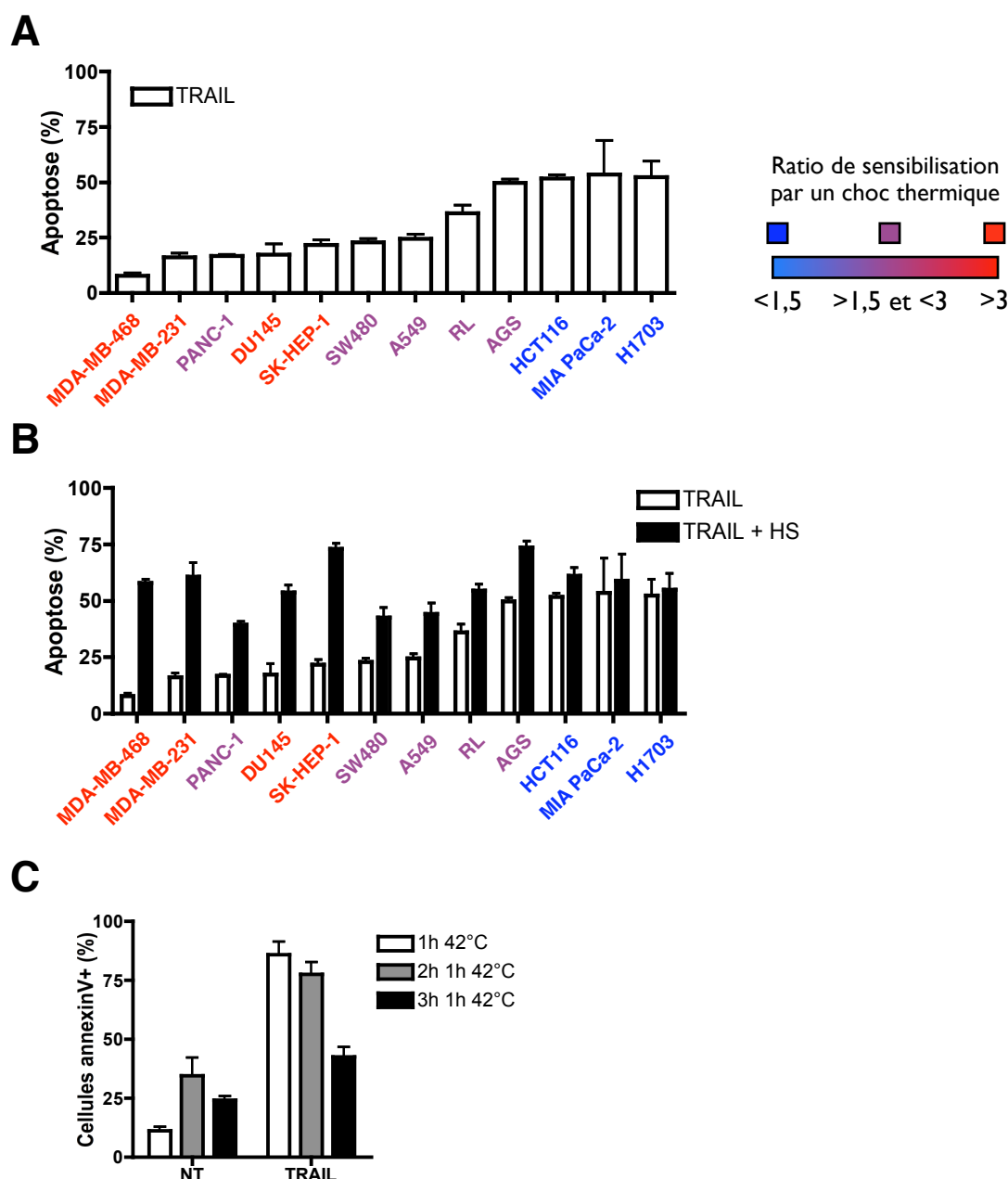


Figure supplémentaire 1. L'hyperthermie, un catalyseur de l'apoptose pour les thérapies anticancéreuses

A. Différentes lignées cancéreuses ont été traitées avec 100 ng/mL (MDA-MB-231, MDA-MB-468, HCT116, H1703 et MIA PaCa-2) ou 500 ng/mL de His-TRAIL (PANC1, SW480, A549, DU145, SK-HEP1, AGS et RL). L'apoptose a été mesurée par comptages après une coloration au Hoechst. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

B. Un ratio de sensibilisation par un choc thermique a été calculé selon la formule $R = A_{T+HS}/A_T$ où R est le ratio de sensibilisation, A_{T+HS} est le pourcentage de cellules apoptotiques après un traitement par TRAIL et par un choc thermique et A_T est le pourcentage de cellules apoptotiques après un traitement par TRAIL. Lorsque R est inférieur à 1,5 la lignée est marquée en **bleu**, lorsque R est compris entre 1,5 et 3 la lignée est marquée en **violet**, lorsque R est supérieur à 3 la lignée est marquée **rouge**.

C. Différentes lignées cancéreuses ont été traitées avec 100 ng/mL (MDA-MB-231, MDA-MB-468, HCT116, H1703 et MIA PaCa-2) ou 500 ng/mL de His-TRAIL (PANC1, SW480, A549, DU145, SK-HEP1, AGS et RL), avec ou sans choc thermique, conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par comptages après une coloration au Hoechst. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

D. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées (TRAIL) ou non (NT) avec 500 ng/mL de His-TRAIL pendant 6h, avec 1h, 2h ou 3h de choc thermique à 42°C. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 2 expériences indépendantes. (n=2).

1. L'hyperthermie, un catalyseur de l'apoptose pour les thérapies anticancéreuses

Les expériences menées au cours de ce projet montrent que l'hyperthermie présente un grand intérêt pour la sensibilisation des cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose induite par TRAIL et par FasL. Cette sensibilisation dépend de FLIP mais lorsque celui-ci n'est pas ou peu exprimé, comme c'est le cas dans certaines lignées, les cellules cancéreuses ne répondent pas à l'hyperthermie (figure 29 - page 108). Cependant, une analyse différente des résultats précédemment présentés permet de mettre en évidence que les lignées qui ne répondent pas à l'hyperthermie sont initialement sensibles à TRAIL (figure sup 1A). Ainsi la combinaison de TRAIL et d'un choc thermique induit une apoptose dans des proportions moyennes à importantes dans toutes les lignées testées (figure sup 1B).

Un traitement thermique de 1h à 42°C est utilisé dans de nombreuses publications et peut être considéré comme un choc thermique "standard" dans l'étude de l'hyperthermie. La sensibilisation à TRAIL obtenue est intéressante mais, de toute évidence, pas optimale. En effet, elle peut être améliorée par la variation de la température (Yoo et Lee, 2007), la synchronisation des traitements (figure 25B - page 98) ou encore la durée du choc thermique. En effet, des résultats préliminaires montrent qu'un choc thermique trop long peut être délétère pour la signalisation apoptotique de TRAIL (figure sup 1C). FLIP étant agrégé dès 30 minutes d'incubation à 42°C, une température ou un temps plus important pourrait être superflu voir inhibiteur dans la mesure ou l'agrégation de FADD et de la caspase-8 est également induite. Ainsi il serait intéressant de déterminer les conditions d'un traitement thermique optimal afin d'élaborer un protocole précis en vue d'une étude préclinique.

Une étude préclinique a déjà été effectuée chez la souris, sur des xénogreffes de tumeurs colorectales humaines issues de la lignée cancéreuse CX-1 (Alcala *et al.*, 2010). Cette étude montre qu'un choc thermique de 1h à 42°C a un effet intéressant *in vivo* malgré le fait que cette lignée cellulaire ne réponde que moyennement à l'hyperthermie *in vitro*. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré l'intérêt de la combinaison de TRAIL avec la radiothérapie (Chinnaiyan *et al.*, 2000; Shankar *et al.*, 2004), dont les effets secondaires toxiques sont nuls à modérés (Niemoeller et Belka, 2013). De plus, l'hyperthermie est également efficace pour sensibiliser aux traitements radiothérapeutiques, sans pour

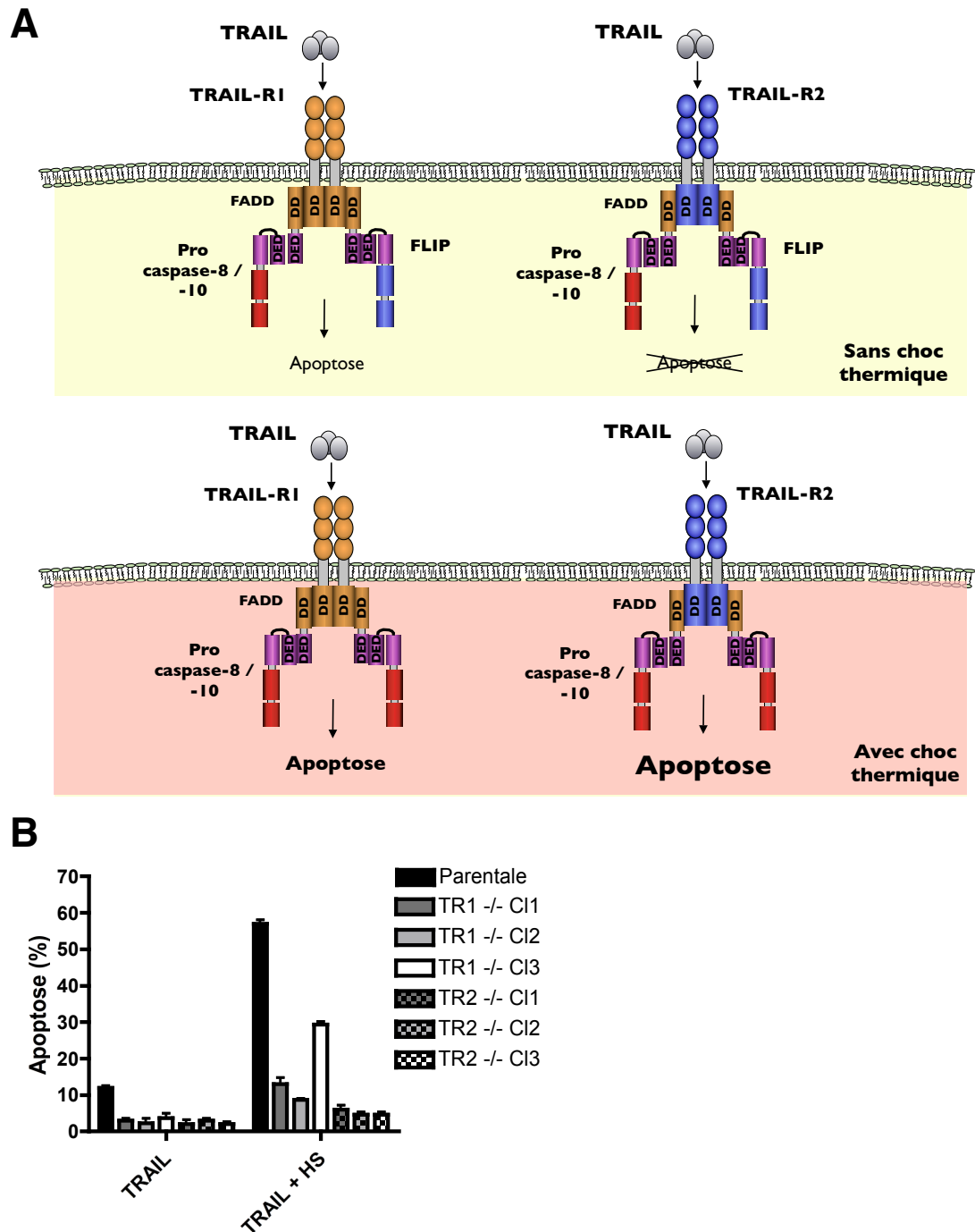


Figure supplémentaire 2. TRAIL-R1 vs TRAIL-R2 - des mécanismes différents qui impliquent FLIP et la caspase-8

A. Sans choc thermique, l'apoptose est induite par DISC composé de TRAIL-R1 mais pas par un DISC composé de TRAIL-R2. Avec un choc thermique, l'apoptose est peu augmentée dans un DISC composé de TRAIL-R1 mais fortement augmentée dans un DISC composé de TRAIL-R2.

B. Les clones de MDA-MB-231 déficients ou non pour le TRAIL-R1 ou le TRAIL-R2 ont été traités avec 50 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans choc thermique pendant 6h. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

autant provoquer des effets secondaires toxiques importants (Varma *et al.*, 2012; Hainfeld *et al.*, 2014). Ainsi, il serait très intéressant d'étudier la faisabilité et l'efficacité *in vitro* puis *in vivo* de la combinaison de TRAIL, de l'hyperthermie et de la radiothérapie. En plus d'une synergie potentiellement très intéressante, l'hyperthermie et la radiothérapie peuvent être appliquées de manière très localisées, limitant ainsi les effets toxiques. En plus de stimuler l'apoptose de TRAIL et de la radiothérapie, l'hyperthermie pourrait également agir en induisant une inflammation associée à une stimulation de la réponse anti-tumorale (Frey *et al.*, 2012) et à une meilleure délivrance du TRAIL ou de ses dérivés aux cellules cancéreuses (Sun *et al.*, 2010).

2. TRAIL-R1 vs TRAIL-R2 - des mécanismes différents qui impliquent FLIP et la caspase-8

Le développement de clones cellulaires déficients pour TRAIL-R1 ou pour TRAIL-R2 a permis d'étudier de manière inédite les différences de fonctionnement entre ces deux récepteurs. L'activation et le recrutement de la caspase-8 semblent se faire différemment sur l'un et l'autre des récepteurs notamment dans la qualité du clivage et la formation des fragments p43/p41 et p18 (figure sup 2A; figure 41 - page 138). Suite à un choc thermique et donc en l'absence de FLIP, l'activation de la caspase-8 semble très difficile lorsque celle-ci est recrutée sur TRAIL-R1, ce qui n'est pas le cas sur TRAIL-R2. Il serait intéressant d'approfondir et de confirmer ces résultats par la déplétion ou la surexpression de FLIP sans hyperthermie. De plus, il est probable que les isoformes L ou S de FLIP agissent différemment sur l'activation de la caspase-8 (Feoktistova *et al.*, 2011).

Si ces résultats se confirment dans d'autres modèles, cela pourrait indiquer que l'hyperthermie est plus efficace en combinaison avec TRAIL ou un dérivé autre que le mapatumumab qui est sélectif de TRAIL-R1 et dont la combinaison a été étudiée par Song et son équipe (Song *et al.*, 2012a; Song *et al.*, 2012b; Song *et al.*, 2013a; Song *et al.*, 2013b).

Les expériences de viabilité cellulaire effectuées peuvent être critiquables sur un point (figure 40B et D - page 134). En effet, celle-ci sont basées sur l'adhérence des cellules

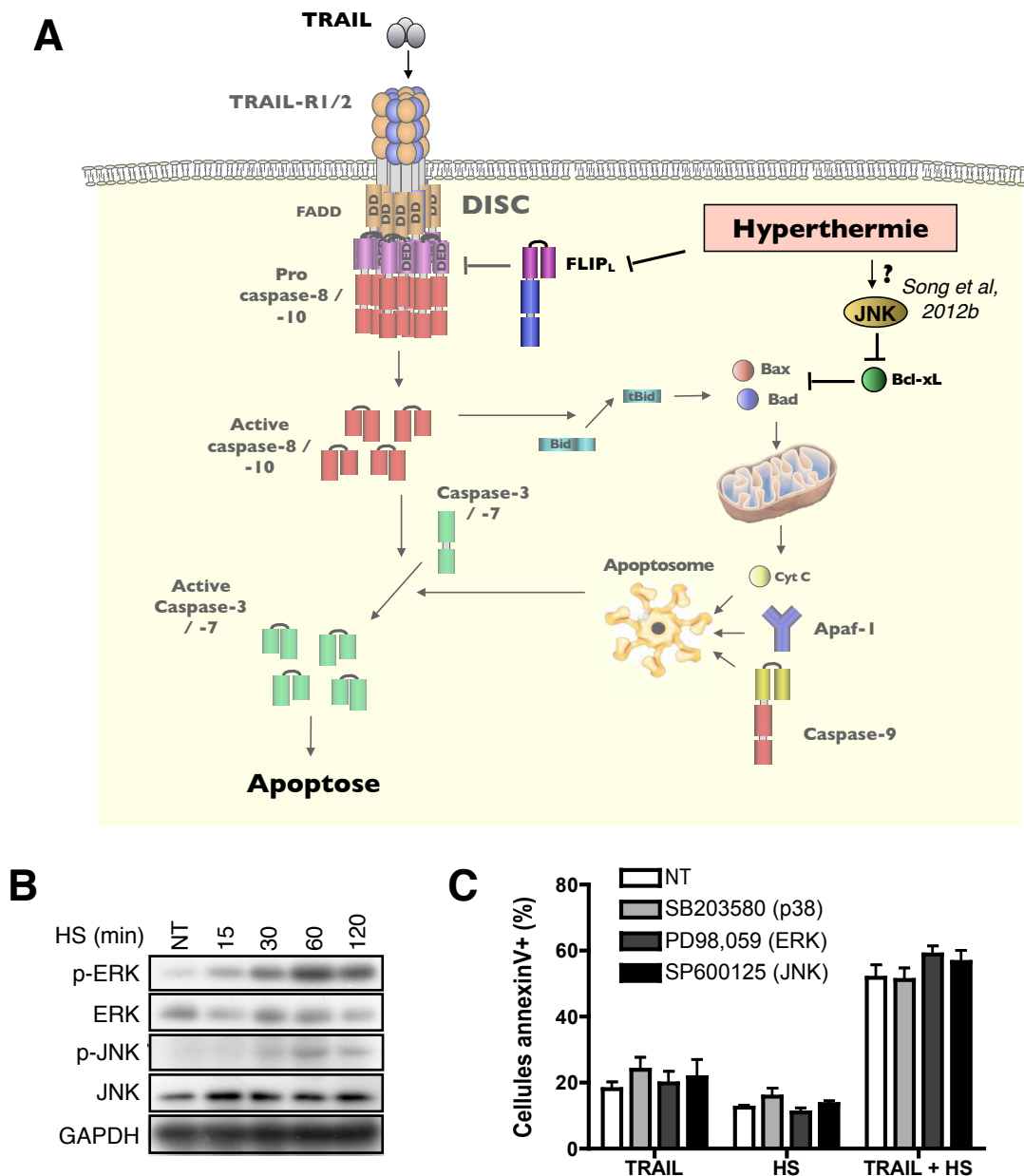


Figure supplémentaire 3. Quel rôle pour la mitochondrie?

A. L'hyperthermie inactive FLIP en provoquant son agrégation et pourrait induire le déblocage de la mitochondrie par la phosphorylation de JNK et de Bcl-xL dans certains modèles.

B. Les cellules SK-HEP1 ont été trait es le temps indiqué par un choc thermique à 42 C, puis les cellules ont été lysées dans un tampon NP-40 1%. Les protéines ont été d tect es par Western blot. (n=1)

C. Les cellules MDA-MB-231 ont été pré-trait es avec 20  M de l'inhibiteur de p38 MAPK, le SB203580, 30  M de l'inhibiteur de Erk, le PD98059, 10  M de l'inhibiteur de JNK MAPK, le SP600125 pendant 1h puis les cellules ont été trait es par 50 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans choc thermique pendant 6h. L'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

après 16h de traitement alors que TRAIL et l'hyperthermie induisent des voies de signalisation cellulaire pouvant mener à une perte d'adhérence sans mort effective des cellules (Secchiero *et al.*, 2004, Somasekharan *et al.*, 2013). La migration des cellules induite par TRAIL pourrait être sélective de TRAIL-R2 (Azijli *et al.*, 2012), ce qui révèle un biais potentiel dans les expérimentations. Par conséquent les observations sur la mort des cellules déficientes pour TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 par TRAIL avec ou sans choc thermique ont été confirmées par comptages suite à une coloration des noyaux au Hoechst (figure sup 2B). De manière similaire aux expériences de viabilité, l'absence de TRAIL-R2 bloque la réponse des cellules à l'hyperthermie, ce qui ne se vérifie pas pour TRAIL-R1.

3. Quel rôle pour la mitochondrie?

Les expériences menées sur le modèle mammaire MDA-MB-231 montrent clairement que le rôle de la voie mitochondriale est minime, voir inexistant dans la sensibilisation à TRAIL par l'hyperthermie (figure 26 - page 100). Ces résultats contredisent en partie le message de plusieurs études sur le sujet (Hermisson *et al.*, 2000; Yoo et Lee, 2008; Alcala *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2012a; Song *et al.*, 2012b). Deux de ces études se basent sur l'observation d'un relarguage cytosolique plus important du cytochrome c pour en conclure que l'hyperthermie agit au niveau de la mitochondrie (Hermisson *et al.*, 2000; Yoo et Lee, 2008). Deux de ces études montrent que l'inactivation ou la surexpression de Bcl-xL ou de Bax permet d'augmenter ou de réduire le clivage de la protéine PARP, une cible de la caspase-3 (Song *et al.*, 2012a; Song *et al.*, 2012b). L'interprétation de ces résultats peut être faite différemment. En effet, le relarguage cytosolique du cytochrome c témoigne seulement d'une activation de la mitochondrie et non de l'implication de celle-ci dans le mécanisme de sensibilisation. La sensibilité ou la résistance obtenue suite à la variation du niveau d'expression de Bax ou de Bcl-xL témoigne que l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique peut être partiellement dépendante de la voie mitochondriale, ce qui n'indique pas non plus que le mécanisme de sensibilisation cible la voie mitochondriale. En effet, l'activation de la mitochondrie dépend directement de la caspase-8 dont l'activité est augmentée par un choc thermique (Yamada *et al.*, 1999).

Deux de ces études ont montré un rôle de l'activation de la MAPKinase JNK par l'utilisation de son inhibiteur, le SP600125, sur la phosphorylation de Bcl-xL et sur le clivage de la PARP au cours d'un cotraitement par TRAIL et par une hyperthermie (figure

sup 3A) (Alcala *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2012b). Bien que les MAPKinases, dont JNK, soient activées au cours d'une hyperthermie (figure sup 3B), le SP600125 n'a pas d'effet sur l'apoptose induite par TRAIL des MDA-MB-231 avec ou sans choc thermique (figure sup 3C). Néanmoins, il est possible que cette caractéristique soit dépendante de la lignée cellulaire utilisée. De plus, les études produites par Song et son équipe sont basées sur des traitements par l'anticorps spécifique de TRAIL-R1, le mapatumumab, et non pas par du TRAIL recombinant. Le fait que le signal apoptotique induit via TRAIL-R1 ou via TRAIL-R2 soit différent complexifie l'interprétation et laisse la possibilité que l'apoptose via TRAIL-R1, pour une raison inconnue, soit plus dépendante de la mitochondrie que celle induite via TRAIL-R2.

Une réponse approfondie à cette question pourrait être apportée en deux étapes, mais peut nécessiter un temps d'investissement relativement important. L'utilisation de différentes populations cellulaires déplétées ou inactivées pour le gène codant pour FLIP (*knock down* ou *knock out*) pourrait montrer si un mécanisme autre que la l'agrégation de FLIP est impliqué dans la sensibilisation par l'hyperthermie ainsi que l'importance de ce mécanisme. Les résultats obtenus par la déplétion de FLIP dans les MDA-MB-231 indiquent que ce n'est pas le cas de cette lignée (figure 30A - page 110). Si certains modèles, comme la lignée colorectale CX-1, sont toujours sensibilisés par l'hyperthermie à l'apoptose induite par TRAIL ou par le mapatumumab en l'absence de FLIP, l'inactivation de Bid et/ou de Bax pourrait démontrer la dépendance à la voie mitochondriale de cet effet. Vérifier le fait que l'activation de la mitochondrie soit bloquée est important et pourrait être fait en révélant l'absence de relarguage cytosolique du cytochrome c.

4. L'agrégation de FLIP

FLIP est l'inhibiteur majeur de l'apoptose extrinsèque (Shirley et Micheau, 2010). Les expériences de déplétion ou d'expression confirment l'importance de cette protéine dans la voie apoptotique de TRAIL (figure 30A et B - page 110). De ce fait, son absence explique pleinement la synergie entre TRAIL et l'hyperthermie, en cohérence avec de nombreuses publications qui montrent l'impact d'une dérégulation de FLIP sur la voie de TRAIL (Yerbes *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013a). Cependant, le fait qu'un choc thermique altère principalement cette protéine mais peu ses homologues, la caspase-8 et la caspase-10, n'est pas encore pleinement compris. Pour expliquer cette

sélectivité, plusieurs hypothèses ont été émises puis écartées dont l'implication d'une modification post-traductionnelle connue, la présence de la boucle FL en position 114 ou le renouvellement rapide de cette protéine (figure 34B, 35A et F - pages 118 et 120). La sensibilité de FLIP à l'hyperthermie serait donc, à priori, due à des caractéristiques intrinsèques structurales. Comme la surexpression dans un modèle de fibrosarcome de FLIP induit son agrégation de manière dépendante aux DED (*death effector domain*) mais pas à son domaine *caspase-like* (Ishioka *et al.*, 2007), cette caractéristique concerne selon toute vraisemblance la structure des DED. De plus, FLIP_S est autant affecté par un choc thermique que FLIP_L et ce variant est essentiellement constitué des DED. Également, les interactions homotypiques entre DED se font par l'intermédiaire de liaisons hydrophobes (Eberstadt *et al.*, 1998), celles-ci sont notamment observées en cristallographie sur les DED de v-FLIP, la protéine homologue virale de FLIP (Yang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Ces caractéristiques hydrophobes sont une particularité propre aux DED, notamment responsables de l'agrégation de la caspase-8 lorsque celle-ci est surexprimée (Siegel *et al.*, 1998). Par comparaison les domaines DD (*death domain*) s'associent par des liaisons électrostatiques (Jeong *et al.*, 1999; Hill *et al.*, 2004). Par ailleurs, les DED sont composés de 6 hélices alpha, énergétiquement moins stables que les feuillets bêta et dont la présence est liée au mécanisme d'agrégation des protéines (Kunjithapatham *et al.*, 2005).

Néanmoins, les expériences faites à l'aide de vecteurs rétroviraux montrent que la surexpression de FLIP maintient sa présence dans la fraction soluble après un choc thermique (figure 33A - page 114). La proportion de FLIP agrégée est donc dépendante de sa quantité, ce qui pourrait éventuellement révéler la saturation d'un mécanisme impliqué dans son agrégation. Autre possibilité, l'agrégation pourrait affecter une quantité fixe de FLIP, ce qui expliquerait, de part sa faible présence, pourquoi FLIP est particulièrement affecté par l'hyperthermie mais également pourquoi sa surexpression maintient une proportion soluble du FLIP. Cette hypothèse pourrait être vérifiée facilement par l'agrégation de FLIP recombinant *in vitro*.

De nombreuses études ont caractérisé l'agrégation d'une protéine par l'observation de son accumulation péri-nucléaire ou par la formation de fibrilles en microscopie (Siegel *et al.*, 1998; Polajnar *et al.*, 2012; Nussbaum-Krammer *et al.*, 2013). Des marquages immuno-fluorescents ont été essayés sans succès, notamment à causes de différents

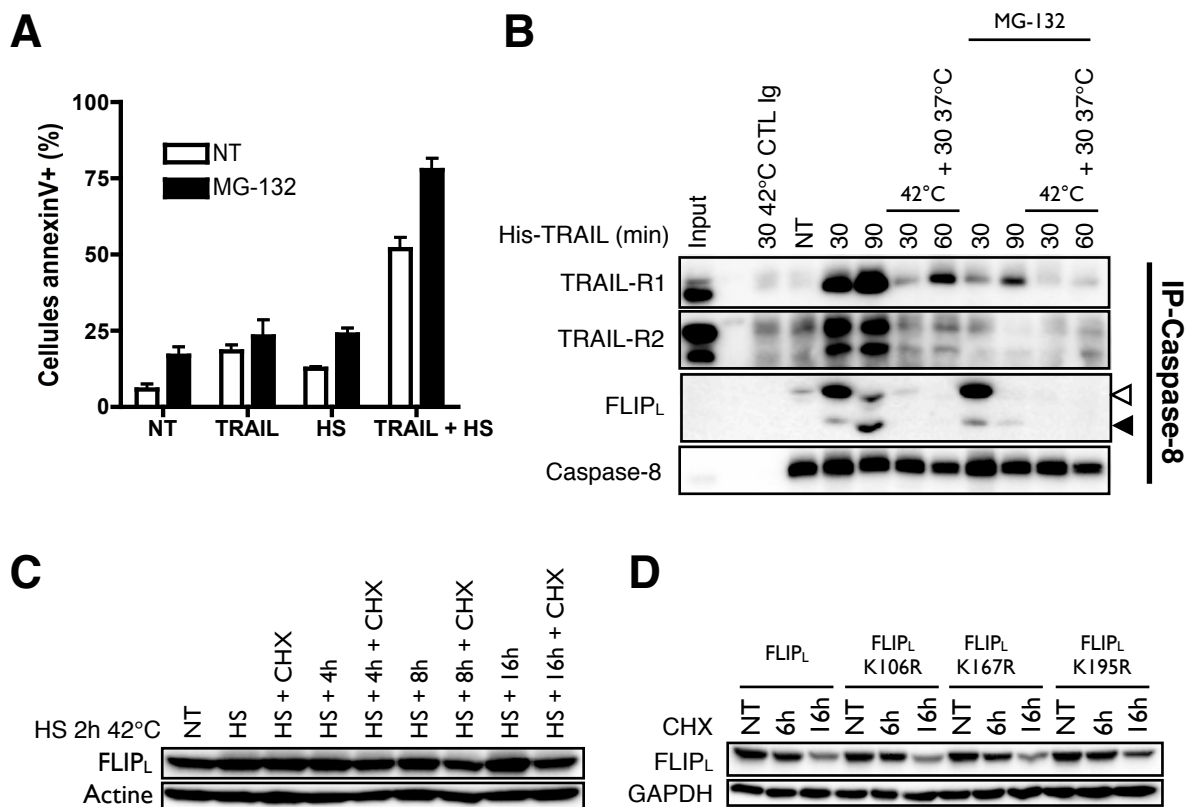


Figure supplémentaire 4. La dégradation de FLIP au cours d'un choc thermique

A. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées ou non pendant 1h par 10 nM de l'inhibiteur du protéasome, le MG-132. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 6h par 50 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans 1h de choc thermique conformément à la figure 23A. L'apoptose a été mesurée par coloration de l'annexinV et par cytométrie. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur 3 expériences indépendantes.

B. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 1h par 1 nM de MG-132, puis par 500 ng/mL de His-TRAIL le temps indiqué. Les cellules ont été lysées et la caspase-8 a été immunoprécipitée. Les protéines ont été révélées par western blot. Les flèches blanches indiquent les protéines natives et les flèches noires indiquent les fragments de clivage. (n=1)

C. Les cellules MDA-MB-231 ont été infectées par des rétrovirus codant pour FLIP_L, puis elles ont subi un choc thermique de 2h à 42°C en présence ou non de l'inhibiteur de la traduction le cycloheximide à 100 µg/mL (CHX). Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pendant 4h, 8h, ou 16h. Elles ont ensuite été lysées partiellement et les protéines ont été révélées par western blot. (n=1)

D. Les cellules MDA-MB-231 ont été infectées par des rétrovirus codant pour FLIP_L ou un mutant de FLIP_L, puis elles ont été traitées ou non par le cycloheximide à 100 µg/mL pendant 6h ou 16h. Les cellules ont ensuite été lysées partiellement et les protéines ont été révélées par western blot. (n=1)

problèmes techniques, dont la quantité très faible de FLIP présent dans les cellules, ainsi que la qualité médiocre (spécificité et avidité) des anticorps anti-FLIP disponibles.

5. La dégradation de FLIP au cours d'un choc thermique - mythe ou réalité?

Plusieurs études ont montré que FLIP subit une dégradation au cours d'un choc thermique (Tran *et al.*, 2003; Imao *et al.*, 2006; Meinander *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2013a). Selon Song et son équipe, FLIP subit une ubiquitination, ce qui mène à sa dégradation totale via le protéasome dans la lignée colorectal CX-1 ainsi que dans la lignée mammaire MDA-MB-231 (Song *et al.*, 2013a). Nos résultats indiquent effectivement que FLIP est dégradé au cours du choc thermique (figure 31A - page 112). Cependant, les proportions de cette dégradation sont incomparablement plus faibles que celles observées par Song et son équipe, alors que les expériences ont été faites à des températures et des temps équivalents ainsi que dans certains cas sur le même modèle (MDA-MB-231). L'inhibition du protéasome favorise l'apoptose induite par TRAIL et par un choc thermique (figure sup 4A) et ne restaure pas la présence de FLIP en complexe avec la caspase-8 (figure sup 4B). Ces observations ne sont pas cohérentes avec le message de Song et n'ont pas été précisées dans sa publication (Song *et al.*, 2013a).

Par ailleurs, selon Song et son équipe la mutation de la lysine 195 inhibe complètement l'ubiquitination et la dégradation de FLIP par un choc thermique. Cette observation n'a pas pu être vérifiée car la faible dégradation du FLIP endogène n'est pas observable sur le FLIP exprimé de manière ectopique, même après un choc thermique de 2h et un temps d'incubation supplémentaire (figure sup 4C). Cependant, la vitesse de dégradation du FLIP ectopique peut être appréciée par l'utilisation de cycloheximide. Ainsi, la mutation de la lysine 195 montre seulement une légère différence de stabilité de FLIP_L dans les MDA-MB-231 à la suite d'un traitement de 16h par le cycloheximide (figure sup 4D).

Les nombreuses différences observées avec les résultats de Song et de son équipe pourraient être expliquées en partie par les techniques de mesures de l'apoptose mais également par l'inexactitude de la température du choc thermique. En effet, il serait possible qu'une température inférieure à 42°C induise une dénaturation suffisante pour provoquer la dégradation de FLIP sans induire son agrégation. Pour les résultats

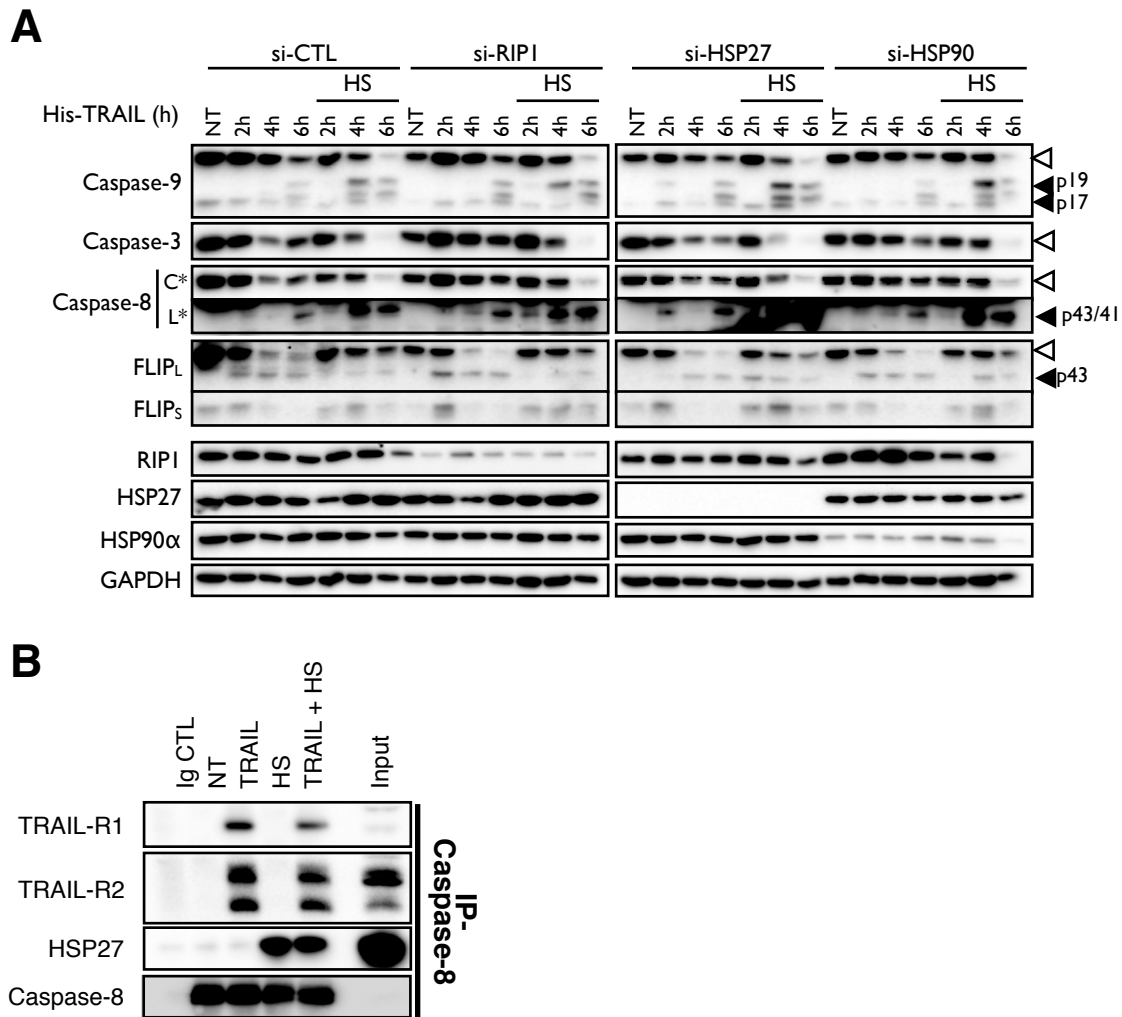


Figure supplémentaire 5. HSP27 le bilan

A. Les cellules MDA-MB-231 ont été stimulées (TRAIL) ou non (NT) avec 500 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans choc thermique pour un temps d'incubation de 30 minutes à 37°C ou 42°C (HS). Les cellules ont été lysées et un anticorps anti-caspase-8 ou un isotype contrôle (Ig CTL) a été utilisé pour une immunoprécipitation (voir matériel et méthode). Les protéines ont été révélées par western blot. (n=1)

B. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des *siRNA* dirigés contre RIP1, HSP27, HSP90 et ou contrôles (CTL), puis elles ont été traitées avec 100 ng/mL de His-TRAIL le temps indique avec (HS) ou sans un choc thermique de 1h à 42°C. Les cellules ont été lysées dans un tampon NP-40 1%. Les protéines ont été révélées par western blot. Les flèches blanches indiquent les protéines natives et les flèches noires indiquent les fragments de clivage. (n=1)

présentés dans ce manuscrit, les cellules ont été plongées et recouvertes dans une eau à 42°C dont l'exactitude de la température a été contrôlée par deux thermomètres indiquant une différence de température inférieure à 0,2°C.

6. HSP27 - le bilan

Au cours de ce projet, plusieurs faits intrigants concernant HSP27 ont pu être observés. Sans surprise HSP27 a un rôle protecteur vis à vis de l'apoptose (figure 37A - page 126) mais ce rôle n'est pas lié à l'agrégation de FLIP (figure 37B et 38B - page 126 et 130) malgré l'importance de cette protéine dans les mécanismes d'agrégation (Ehrnsperger *et al.*, 1997). Cependant, comme cela peut être observé pour HSP90 (figure 37D - page 126), l'absence d'HSP27 est susceptible d'induire un stress cellulaire associé à la surexpression d'autres HSP par un phénomène de compensation (Lee *et al.*, 2013). De ce fait, il y a un risque que lors de sa déplétion, la fonction chaperon d'HSP27 soit contrebalancée par celles d'autres membres de sa famille, tel que l' α B-crystallin qui possèdent des propriétés similaires (Ganea, 2001; Markov *et al.*, 2008; Boelens *et al.*, 2014). Par ailleurs, les expériences faites suite à l'expression ectopique par une infection rétrovirale pourraient ne pas être objectives pour plusieurs raisons. La phosphorylation d'HSP27 est importante pour sa fonction (Rogalla *et al.*, 1999), or celle-ci se fait de manière dynamique pour permettre l'adaptation des oligomères à leurs cibles (Arrigo *et al.*, 1988a; Paul *et al.*, 2010). Le mutant phosphomimétique 3D ne peut pas être représentatif des formes phosphorylées d'HSP27 pour ce manque de dynamisme. Par ailleurs, il semblerait que la quantité d'HSP27 exprimée pourrait être trop importante pour être correctement activée et fonctionnelle (figure 38A - pages 130). De plus, le fait que les protéines de la famille des HSP agissent en collaboration les unes avec les autres est également un facteur pouvant expliquer le manque d'activité de l'HSP27 ectopique (Patel *et al.*, 2005; Sreedharan *et al.*, 2011; Mattoo *et al.*, 2013; Arrigo, 2013). Une autre manière d'étudier HSP27 en contournant les mécanismes potentiels de compensation serait par l'utilisation d'un inhibiteur chimique de la fonction d'HSP27, dont le seul connu est le RP101/brivudine, commercialisé depuis peu (Heinrich, *et al.*, 2011). L'utilisation de l'inhibiteur de la p38 MAPKinase, le SB203580, a été essayée sans qu'aucun effet n'ait pu être observé sur l'apoptose induite par TRAIL avec ou sans choc thermique (figure sup 3C).

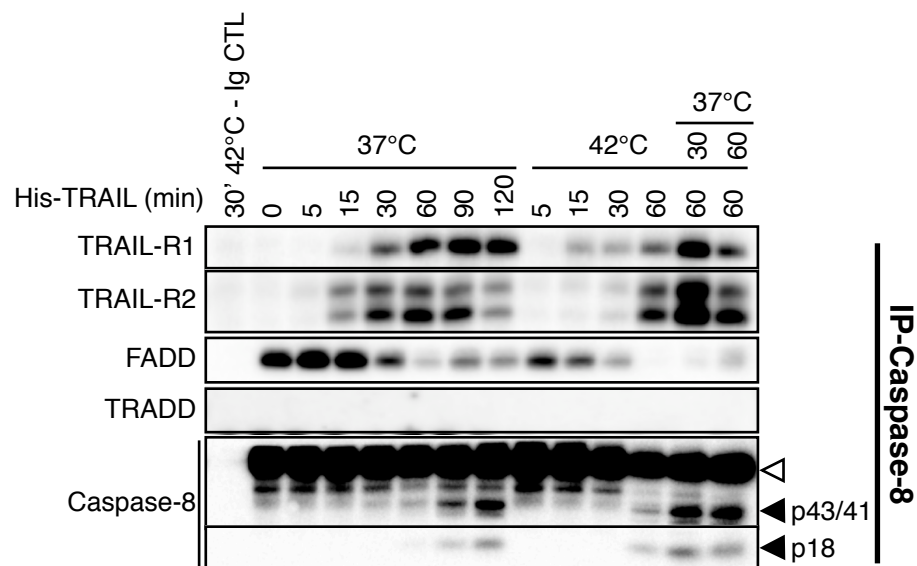


Figure supplémentaire 6. Le rôle de FADD dans l'apoptose induite par TRAIL et par l'hyperthermie
 Les cellules MDA-MB-231 ont été stimulées (TRAIL) ou non (NT) avec 500 ng/mL de His-TRAIL avec ou sans choc thermique pour un temps d'incubation de 30 minutes à 37°C ou 42°C (HS). Les cellules ont été lysées et un anticorps anti-caspase-8 ou un isotype contrôle (Ig CTL) a été utilisé pour l'immunoprécipitation (voir matériel et méthode). Les protéines ont été détectées par Western blot. (n=1)

L'activité anti-apoptotiques d'HSP27 mise en évidence suite à sa déplétion ou son expression ectopique pourrait être expliquée par ses nombreux rôles d'inhibiteur de la caspase-3, la caspase-9, le cytochrome-c ou encore Bid (Garrido *et al.*, 1999; Bruey *et al.*, 2000; Paul *et al.*, 2002; Voss *et al.*, 2007). Cela est appuyé par le fait que la caspase-9, et en moindre mesure la caspase-3, sont activées de manière plus importante suite à la déplétion d'HSP27 (figure sup 5A). Par ailleurs, la présence d'HSP27 sur la caspase-8 au cours d'un choc thermique et de manière plus incertaine dans le DISC (figure 27), pourrait révéler qu'une fraction de la caspase-8 est dénaturée, ce qui est très vraisemblable. Cela pourrait également indiquer un nouveau rôle d'HSP27 vis à vis de la caspase-8. En ce sens, le recrutement et l'activation de la caspase-8 dans le DISC au cours du choc thermique sont inhibés (figure 27 - page 102), ce qui pourrait être lié à sa potentielle dénaturation ou à la présence d'HSP27. Des expériences supplémentaires ont montré qu'HSP27 se fixe sur la caspase-8 lors d'un choc thermique indifféremment d'un traitement par TRAIL (figure sup 5B). Bien que la spécificité de cette liaison semble incertaine dans d'autres modèles (non montré), il aurait été intéressant de regarder si la déplétion ou la surexpression d'HSP27 a un impact sur le recrutement et l'activation de la caspase-8 dans le DISC.

7. Le rôle de FADD dans l'apoptose induite par TRAIL et par l'hyperthermie

FADD est l'un des principaux constituants du DISC de TRAIL et il est nécessaire à l'induction du signal apoptotique (Wajant *et al.*, 1998; Kuang *et al.*, 2000). Pourtant, suite à un choc thermique FADD est très peu recruté dans le DISC et sur la caspase-8 malgré la présence et l'activation importante des caspases 8 et 10 (figure sup 6 et figure 27 - page 102). Cette observation peut être mise en relation avec le modèle de Dickens où la caspase-8 est présente dans le DISC en quantité jusqu'à neuf fois plus importante que FADD (Dickens *et al.*, 2012). Ces proportions sont cruciales pour l'activation de la caspase-8 et pourrait donc éventuellement expliquer en partie la qualité de l'activation de la caspase-8 après un choc thermique. TRADD, une protéine homologue de FADD et décrite dans la signalisation par le TNF (Hsu *et al.*, 1995), peut également être recruté dans le DISC de TRAIL (Schneider *et al.*, 1997a), ce qui laisse la possibilité que FADD soit remplacé par TRADD. Néanmoins, la présence de TRADD en complexe avec la caspase-8 n'a pas été détectée (figure sup 6). Ainsi, il aurait été intéressant de répondre à

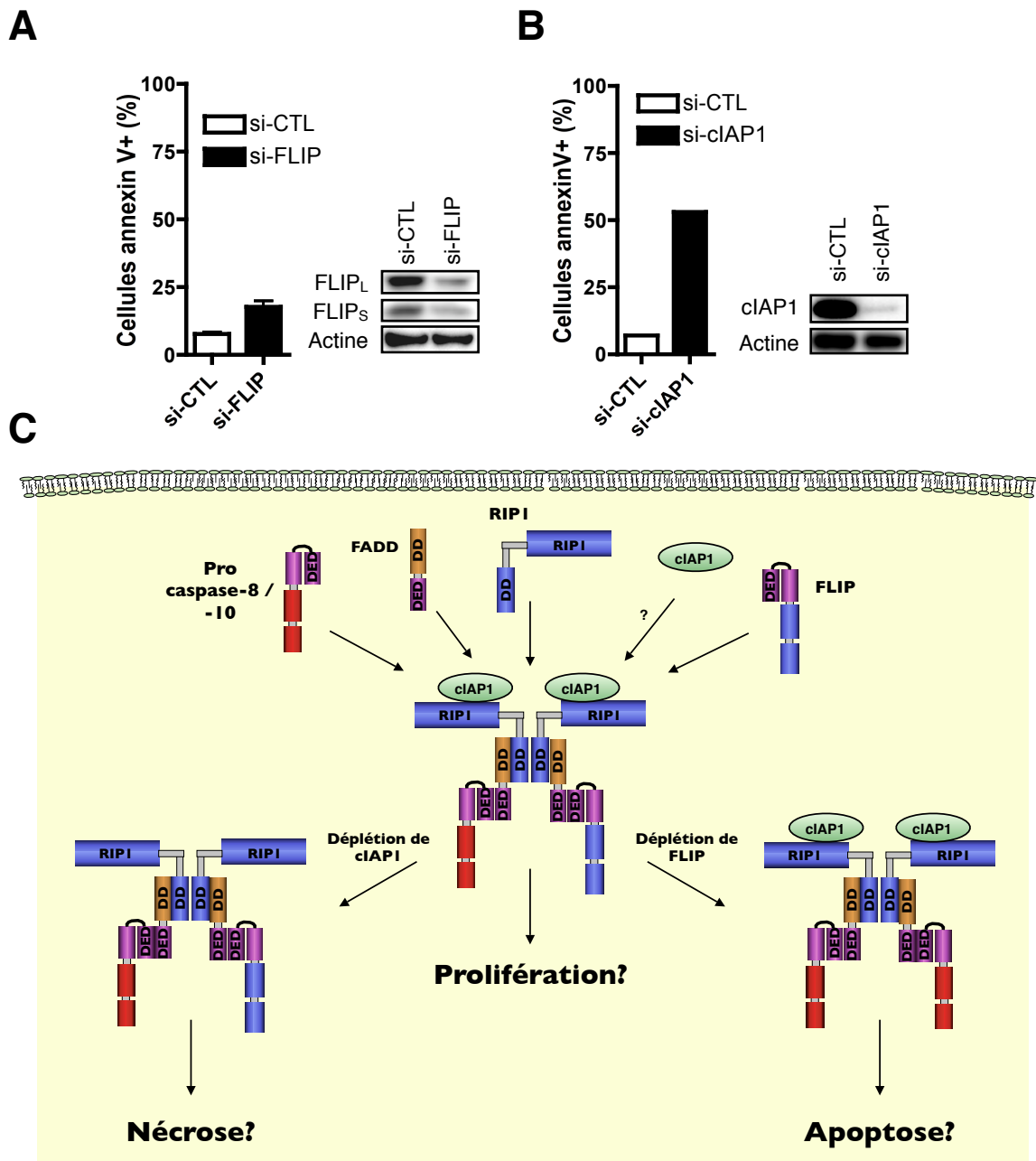


Figure supplémentaire 7. La présence d'un complexe FADD/C8/FLIP/RIP1 à l'état basal

A. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des *siRNA* contrôles ou dirigés contre FLIP. Après 72h d'incubation, l'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux. Les niveaux d'expression de FLIP ont été contrôlés par Western blot. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins 3 expériences indépendantes.

B. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec des *siRNA* contrôles ou dirigés contre cIAP1. Après 72h d'incubation, l'apoptose a été mesurée par marquage à l'annexine V et par cytométrie en flux. Le niveau d'expression de cIAP1 a été contrôlé par Western blot.

C. La présence d'un complexe composé des caspases 8 et 10, de FADD, de FLIP et de RIP1 à l'état basal pourrait favoriser la prolifération des cellules. La déplétion de FLIP ou de cIAP1 pourrait induire l'apoptose ou la nécrose des cellules par ce même complexe.

la question de la dépendance à FADD de la signalisation apoptotique induite par la combinaison de TRAIL et d'une hyperthermie par une déplétion ou par l'utilisation de lignées cellulaires déficientes. Bien que FADD soit probablement aussi indispensable que la caspase-8 (figure 24A - page 96), l'inverse révélerait un mécanisme apoptotique nouveau.

8. La présence d'un complexe FADD/C8/FLIP/RIP1 à l'état basal

Dans notre modèle de MDA-MB-231, il a été systématiquement observé à l'état basal un ou plusieurs complexes formés de la caspase-8, de la caspase-10, de FADD, de FLIP et en moindre mesure de RIP1 (figure 27 - page 102 et figure sup 6). Ce complexe semblable au ripoptosome (Tenev *et al.*, 2011) ou au complexe secondaire du TNF (Micheau et Tschopp, 2003), n'est pas décrit dans la littérature. En ce sens, une étude a montré que les cellules MDA-MB-231 sont autocrines pour le TNF α (Bertrand *et al.*, 2008). Les cellules de la lignée mammaire MDA-MB-231 sont robustes, elles se développent rapidement à raison d'environ un doublement par jour et très peu de cellules mortes sont observées en l'absence de traitement. Ce complexe n'est donc, à priori, pas toxique. La question de sa fonction et l'intérêt pour les cellules se pose, dans la mesure où les protéines caspase-8, FADD, FLIP et RIP1 sont toutes impliquées directement ou indirectement dans des mécanismes prolifératifs (Gilot *et al.*, 2005; Pellegrini *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011b). Par ailleurs, la simple déplétion de FLIP induit une augmentation de la mort cellulaire spontanée (figure sup 7A), ce qui pourrait être lié à la présence de ce complexe. Également, la déplétion de la protéine cIAP1, connue pour inhiber la nécrose dépendante du ripoptosome par la dégradation de RIP1 (Tenev *et al.*, 2011), induit une forte augmentation de la mort en l'absence de tout traitement (figure sup 7B). Ainsi il serait imaginable que des complexes de ce type se forment en l'absence de stimulation dans les cellules cancéreuses afin de favoriser leur prolifération, ce qui pourrait être contrebalancé par l'induction d'une mort de type apoptotique ou nécrotique en l'absence de régulateurs tels que FLIP et cIAP1 (figure sup 7C).

Ainsi, il serait intéressant d'approfondir la nature et les rôles de ce complexe sur la mort cellulaire, la prolifération ou la migration des cellules par la déplétion ou l'inhibition de la caspase-8, de FLIP, de RIP1 et de cIAP1. La dépendance de ce complexe aux voies TNF, FasL ou TRAIL autocrines pourrait être évaluée par l'utilisation d'anticorps bloquants.

Conclusion générale

Depuis sa découverte en 1995, TRAIL a suscité un engouement pour ses propriétés anti-cancéreuses. Les essais cliniques ont révélé que TRAIL et ses dérivés sont confrontés à de nombreux mécanismes de résistance, ce qui réduit leur utilisation à des combinaisons permettant de restaurer une certaine efficacité tout en limitant les effets toxiques pour les patients.

Notre équipe de recherche travaille depuis plusieurs années à identifier l'origine de ces résistances et les moyens possibles de les contourner. Nous avons développé ce projet afin de mettre en lumière l'intérêt et les mécanismes de l'hyperthermie en tant qu'adjuvant à TRAIL ou à ses dérivés.

Les axes de recherches empruntés ont permis de confirmer et d'infirmer certaines connaissances actuelles en donnant un nouveau point de vue sur l'action et la portée de cette combinaison.

- Nos travaux confirment que l'hyperthermie est un moyen efficace pour pallier aux mécanismes de résistance à TRAIL développés par de nombreuses cellules cancéreuses. Cette combinaison s'est avérée efficace dans toutes les lignées testées, y compris pour les plus résistantes à TRAIL et ce indifféremment de leur origine tissulaire.

- Les mécanismes de sensibilisation impliquent principalement l'agrégation de FLIP, l'inhibiteur majeur de la voie apoptotique de TRAIL. Nous confirmons que cette protéine

est en partie dégradée au cours d'un choc thermique mais réfutons le fait que ce mécanisme soit responsable de la sensibilisation observée. La mitochondrie n'est pas ou peu impliquée dans la synergie advenant au sein du modèle mammaire MDA-MB-231, cependant nous ne pouvons réfuter la possibilité que cette voie puisse s'avérer plus signifiante dans d'autres modèles.

- L'agrégation de FLIP au cours d'une hyperthermie paraît spontanée et ne nécessite pas, à priori, de modification ou de partenaire moléculaire. Seule la surexpression de l'ensemble des protéines de la famille des HSP semble inhiber partiellement son agrégation.

Matériel et méthode

Molécules chimiques et production de ligands

Le His-TRAIL et le FasL ont été produits comme décrit précédemment (Schneider, 2000). La staurosporine a été commandée chez Sigma-Aldrich (Sigma, Lyon, France). L'inhibiteur de Bax (*Bax chanel blockers*) a été commandé chez Santa Cruz Biotechnology (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France). Le MG-132 (Cat# 1748) a été obtenue chez Tocris (Tocris, Bristol, United Kingdom) et le cycloheximide (Cat# ALX-380-269) a été obtenue chez EnzoLife science (EnzoLife science, Villeurbanne, France). L'inhibiteur des caspases, le z-VAD-fmk (ALX-260-020), a été commandé chez EnzoLife science.

Anticorps

Pour l'analyse par western blot, les anticorps anti-TRAIL-R1 (Cat# AB16955), anti-TRAIL-R2 (Cat# AB16942) ont été commandés chez Chemicon (Millipore, Molsheim, France), les anti-FADD (Cat# 610400) et anti-RIP1 (Cat# 6100458) ont été obtenus de Transduction Laboratories (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), les anti-caspase-8 (clone 5F7) et anti-caspase-10 (clone 4C1) ont été obtenus de Medical & Biological Laboratories (Clinisciences, Montrouge, France). Les anticorps dirigés contre les fragments actifs de la caspase-3 (clone 8G10), anti-caspase-9 (clone D315), p-HSP27 S82 (clone D1H2) et PARP (clone Asp214) ont été commandé chez Cell Signaling (Millipore). Les anti-HSC-70 (B-6), anti-GAPDH (clone 0411) ont été obtenus de Santa Cruz Biotechnology. Les anti-FLIP (clone 7F10), HSP27 (clone G3.1), p-HSP27 S15 (Cat# ADI-SPA-525), p-HSP27 S78 (Cat# ADI-SPA-523), HSP70 (clone C92F3A-5) et HSP90B (clone K3705) ont été obtenus de EnzoLife science. Les anti-HSP90A (clone D7a), et anti-Bcl-XL (clone E18) ont été commandés chez ABCAM (ABCAM, Paris, France).

Pour la cytométrie en flux, les anti-TRAIL-R1 (clone wB-K32), anti-TRAIL-R2, (clone B-L27), ont été fournis par Diaclone (Besançon, France). L'anticorps secondaire utilisé était un Alexa-488 chèvre anti-souris commandé chez molecular probes (Life technologies, Saint Aubin, France).

Culture cellulaire

Les lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-468 (Carcinome mammaire humain), A549 et H1703 (Carcinome du poumon humain), SK-HEP1 (hepatocarcinome humain), SW480, HCT116, HT-29 (adenocarcinome humain du colon), MIA PaCa-2 (carcinome humain du pancréas), HeLa, SiHa et Caski (adénocarcinome squameux humain), DU145 (carcinome de la prostate humaine) et U2OS (ostéosarcome humain) ont été cultivées avec du Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) haut en glucose (Dutscher, Brumath, France) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Dutscher). Les lignées cellulaires AGS (adenocarcinome gastrique humain), PANC-1 (carcinome humain du pancréas), Jurkat et RL (Lymphome humain) ont été cultivées en RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) (Dutscher, Brumath, France) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Dutscher). Toutes les cellules ont été cultivées en étuve à 37°C et à 5% CO₂.

Dérégulation des gènes par des petits ARN interférents (*siRNA*)

Les *siRNA* ont été transfectés à l'aide d'Interferin commandé chez Polyplus (Polyplus transfection, Illkirch, France) selon le protocole du fournisseur. Les *siRNA* dirigés contre Bid (Cat# L-004387-00), la Caspase-9 (Cat# L-003309-00), la Caspase-8 (Cat# L-003466-00), HSP90A (Cat# L-005186-00), HSP90B (Cat# L-005187-00), RIP1 (Cat# L-004445-00), FLIP (Cat# L-003772-00) et les *siRNA* contrôles (Cat# L-001810-10-05) ont été commandés chez Dharmacon (Enzolife science). Les *siRNA* dirigés contre HSP27 (Cat# AM16708) ont été obtenus chez Ambion (Life technologies). Les *siRNA* dirigés contre HSP70 (Cat# SASI_Hs01_00051449) ont été commandés chez Sigma-Aldrich.

Production de rétrovirus et infection des cellules

La production des vecteurs rétroviraux codant pour Bcl-xL, FLIP_L, les mutants de FLIP_L et FLIP_S ont été précédemment décrits (Morizot *et al.*, 2011). Les cellules ont été infectées pendant 16h avec du surnageant de la production virale contenant du polybrène (8 mg/ml), lavées en HBSS et cultivées en milieu complet contenant de la puromycine (2.5 mg/ml) (Cat# ant-pr-1) commandée chez Invivogen (Invivogen, Toulouse, France).

Traitement par TRAIL et par une hyperthermie

Les cellules ont été traitées par les concentrations indiquées de His-TRAIL ou de la molécule indiquée dans un milieu de culture complet et frais, puis les cellules ont été traitées thermiquement à 42°C pour 1h ou le temps indiqué en bain marie ou en incubateur à 37°C. Les cellules ont été incubé 5h supplémentaires ou le temps indiqué en incubateur à 37°C puis analysées selon la méthode indiquée.

Comptages Hoechst

L'apoptose a été évaluée par comptages au microscope suite à une coloration au Hoechst (20 µg/mL) en PBS et PFA 1%. Les cellules avec un noyau condensé ou fragmenté ont été comptées comme positive sur au moins 300 cellules par condition dans 3 champs différents. Les tests statistiques ont été faits sur au moins 9 valeurs correspondant à 9 champs sur 3 expériences indépendantes.

Analyse de l'apoptose par marquage de l'Annexin V

La solution de coloration à l'Annexine V-FITC a été obtenue de Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec, Paris, France). Le marquage a été fait selon le protocole du fournisseur. Les cellules ont été analysées avec un cytomètre en flux BD-LSR2 (BD Biosciences) en accord avec le protocole du fournisseur. Les expériences ont été répétées au moins 3 fois.

Expérience de viabilité

Les cellules ont été implantées à $5 \cdot 10^4$ cellules par puits en plaque 96-puits et incubées pendant 16h avec des concentrations croissantes de His-TRAIL (de 0 à 25 000 ng/mL). Les cellules non adhérentes ont été éliminées par les lavages en PBS, les cellules adhérentes ont été fixées avec une solution de PBS avec 2% de PFA pendant 20 minutes, colorées avec une solution avec 0,5 % de bleu de méthylène et l'absorbance a été mesurée à 620 nm. Les expériences ont été répétées au moins 3 fois.

Analyse des activités caspases

Les cellules ont été implantées à 10^3 cellules par puits le jour précédent l'expérience. les cellules ont été traitées avec 50 ng/mL le temps et à la température indiquée. Les activités Caspases -3/-7 (Cat# G8090), Caspase-8 (Cat# G8200) et Caspase-9 (Cat# G8210) ont été mesurées par luminométrie avec un kit commercial commandé chez

Promega (Promega France, Charbonnière, France) selon le protocole du fournisseur. Les expériences ont été répétées au moins 3 fois. Le principe de la mesure repose sur un substrat luminogène rendu disponible pour une luciférase suite au clivage d'une séquence spécifique de la caspase ciblée (IETD, DEVD, LEHD).

Test statistique

Le test de student a été utilisé pour les analyses statistiques.

Immunoprécipitation

Pour l'analyse des complexes, 50 millions de MDA-MB-231 en flasque de T175 cm² ont été stimulées avec 12 mL de DMEM complet contenant 500 ng/mL de His-TRAIL le temps et à la température indiquée. Les cellules ont été rincées avec du PBS froid, grattées et lysées dans 1 mL de tampon de lyse contenant 1% NP40, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl et 10% glycérol. Les lysats ont été centrifugés 12 minutes à 10 000g et les liaisons non-spécifiques des surnageants ont été éliminés par une incubation de 1h à 4°C avec des billes de Sepharose 6B (Sigma-Aldrich). Les protéines ciblées ont été immunoprécipitées sur la nuit à 4°C avec des billes de sepharose couplées à la protéine-G (Cat# 17-0618-01) commandées chez GE Healthcare (Dutscher) et un anticorps anti-Histidine (clone AD1.1.10) commandé chez AbD serotec (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France) ou un anti-Caspase-8 (clone C-20) commandé chez Santa Cruz Biotechnology. Les billes ont été rincées 3 fois dans le tampon de lyse, les immunoprécipitats ont été élués en tampon de chargement (Tris-HCl 63 mM, SDS 1%, rouge de phénol 0.03%, glycérol 10% et DTT 100 mM à pH 6.8 - concentration finale) et bouillit pendant 5 min avant d'être chargé en western blot.

Lysats et fractionnement

Lyse totale : Les cellules ont été traitées dans les conditions et le temps indiqué, rincées en PBS froid, lysées dans un tampon contenant 1% de SDS, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl et 10% glycérol, soniquées 10s à 10% d'amplitude et bouillies pendant 5 min avant d'être chargés en western blot.

Lyse partielle NP-40 1% : Les cellules ont été traitées dans les conditions et le temps indiqué, rincées en PBS froid et lysées dans un tampon contenant 1% de NP40, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl et 10% glycérol. Les lysats ont été centrifugés 12 min à 10 000g, les surnageants ont été conservés et chargés après ajout du tampon de charge

(Tris-HCl 63 mM, SDS 1%, rouge de phénol 0.03%, glycérol 10% et DTT 100 mM à pH 6.8 - en concentration finale), bouillis pendant 5 min avant d'être chargés en western blot.

Fractionnement soluble et insoluble en NP40 1% : Les cellules ont été lysées en NP-40 1% comme précédemment indiquées. Les surnageants, après ajout du tampon de charge (Tris-HCl 63 mM, SDS 1%, rouge de phénol 0.03%, glycérol 10% et DTT 100 mM à pH 6.8 - en concentration finale), ont été bouillis pendant 5 min avant d'être chargés en western blot en tant que fraction soluble. Les culots ont été resuspendus directement en tampon de charge, soniqués 10s à 10% d'amplitude et bouillit pendant 5 min avant d'être chargés en western blot en tant que fraction insoluble.

Fractionnement subcellulaire : Les cellules ont été traitées dans les conditions et le temps indiqué, rincées en PBS froid, lysées et fractionnées avec un kit commercial (Cat# 78840) commandé chez Pierce (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) selon le protocole du fournisseur. Le principe du fractionnement repose sur la solubilité des constituants cellulaires successivement repris dans des tampons de plus en plus stringents. Les étapes sont entrecoupées de centrifugations de plus en plus rapide pour séparer les phases soluble et insoluble dans chaque tampon. Les fractions obtenues ont été bouillies et chargées comme précédemment.

La concentration protéique des lysats a été ajusté suite à leur dosage par la méthode de Lowry à l'aide d'un kit (Cat# 500-0113, 500-0114 et 500-0115) obtenu chez Bio-rad (Marnes-la-Coquette, France).

Western blotting

Les immunoprécipitats ou les fractions et lysats cellulaires ont été séparés sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE et transférés sur une membrane de PVDF obtenues chez amersham (Biosciences, Les Ullis, France). Les sites non-spécifiques ont été masqués par un incubation dans du PBS contenant 0.01% de Tween 20 et 5% de lait en poudre dégraissé. Les immunoblots ont été incubés avec un anticorps primaire spécifique suivie d'un anticorps secondaire correspondant, conjugué à l'enzyme HRP. Les marquages ont été développés par chimioluminescence un ECL (Cat# K-12042-C20) obtenu chez Advansta (Diagomics, Blagnac, France) en accord avec le protocole du fournisseur.

Isolation des radeaux lipidiques

50 millions de cellules ont été traitées puis lysées dans un tampon de lyse de lubrol (0,5 % de lubrol, Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM) à 4°C. Les radeaux ont été isolés sur un gradient de sucrose de 5 à 80% par ultracentrifugation (100 000g, 20h, 4°C). Les fractions ont été retirées une à une à la pipette, supplémentées par un tampon de charge (Tris-HCl 63 mM, SDS 1%, rouge de phénol 0.03%, glycérol 10% et DTT 100 mM à pH 6.8 - en concentration finale) et bouillis pendant 5 min avant d'être chargés en western blot.

Annexes

- Curriculum Vitae

- **Article 1** soumis à Cell Death and Disease : Morlé A, Garrido C, Micheau O. Hyperthermia restores apoptosis induced by death receptors through aggregation-induced c-FLIP cytosolic depletion.

- **Article 2** : Lalaoui N, Morle A, Merino D, Jacquemin G, Iessi E, Morizot A, Shirley S, Robert B, Solary E, Garrido C, Micheau O. TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through AKT. PLoS One 2011; 6: e19679.

Aymeric Morlé

Etudiant doctorant

Mail : aymeric.morle@gmail.com

Mobile : 06 50 31 15 99

Date de naissance : 21/12/1987 France

Expérience Professionnelle

Doctorat de Sciences spécialisé en Cancérologie :

10/2010 - en cours Etude des mécanismes de sensibilisation à l'apoptose induite par **TRAIL** par l'**hyperthermie**.
INSERM U866 « Lipide Nutrition Cancer » à Dijon.
Responsable : Olivier Micheau, 03 80 39 34 68 omicheau@u-bourgogne.fr

Stage de Master 2 (DEA) :

01/2010 - 06/2010 Etude de la **signalisation** du récepteur leurre **TRAIL-R4**.
07/2009 - 08/2009 INSERM U866 « Lipide Nutrition Cancer » à Dijon.
Responsable : Olivier Micheau.

Stage de Master 1 :

01/2009 - 02/2009 Mise au point d'un marquage immunohistochimique de l'inflammasome NALP3 dans le processus d'athérosclérose. - LPPCE - Université de Bourgogne - Dijon.
Responsable : Pr Jean-Louis Connat jean-louis.connat@u-bourgogne.fr

Diplômes et formation

2007 – 2010 : Université de Bourgogne, Dijon :

- **Master 2 Recherche**, Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire obtenu avec **mention B**, rang 4/24 en juin 2010.
Option: Cancérologie.
- **Master 1** Biochimie Moléculaire et cellulaire obtenu avec **mention AB** en juin 2009.
Option : Chimie extractive et structurale des composés naturels.
- **Licence** de Biochimie obtenue avec **mention AB** en juin 2008
Option : Cytologie Animale Appliquée.

2005 – 2007 : IUTA Lyon 1, Bourg en Bresse :

DUT Génie Biologique option Industries Alimentaires et Biologiques (IAB) obtenu en juin 2007.

2005 : Baccalauréat STL Biochimie, Génie Biologique avec **mention AB** en juillet 2005.

Compétences

- **Biologie cellulaire** : Culture de lignées cellulaires en niveau de confinement L2. Infection rétrovirale, transfection, ARNi. Marquage immunofluorescent et cytométrie en flux. Test de toxicité, apoptose et nécrose.
- **Biologie moléculaire / Biochimie** : Extraction ARN, PCR, RT-PCR, qPCR, clonage. Production de plasmides et de protéines recombinantes. Western Blot et immunoprécipitation.
- **Expérimentation animale**: Croissance tumorale In Vivo.
- **Gestion de projet** : Veille bibliographique, organisation, planification des expérimentations, encadrement du personnel étudiant.
- **Informatique** : Système d'exploitation Windows ou Mac OSX.
Pack office Microsoft (Word, Excel, powerpoint) ou Iwork8 (Page, Number, Keynote).
Bases de données bioinformatiques : NCBI (pubmed, blast...), HPRD.
Logiciels spécifiques : Graphpad Prism, Ape, Flowjo, EndNote, EnzymeX.
- **Langue** : Maîtrise de l'anglais rédactionnel et conversationnel.

Publications

Jacquemin G, Granci V, Gallouet AS, Lalaoui N, **Morle A**, Iessi E, Morizot A, Garrido C, Guillaudeux T, Micheau O. Quercetin-mediated Mcl-1 and survivin downregulation restores TRAIL-induced apoptosis in non-Hodgkin's lymphoma B cells. **Haematologica**; 97: 38-46 (2011).

Lalaoui N, **Morle A**, Merino D, Jacquemin G, Iessi E, Morizot A, Shirley S, Robert B, Solary E, Garrido C, Micheau O. TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through AKT. **PLoS One**; 6: e19679 (2009).

Communication scientifique et autres

2011 - 2013 : Membre du conseil de l'école doctorale N°554 Environnement-Santé Bourgogne-Franche-Comté élu en tant que représentant doctorant - Attribution des allocations ministérielles de recherche.

13 et 14 juin 2013 - Dijon : Présentation d'un poster et modération des sessions orales au 18e forum des jeunes chercheurs (FJC).

06 mai 2013 - Toulouse : Présentation d'un poster au congrès "Cancer cell death and resistance".

16 juin 2011 - Dijon : Présentation d'un poster au 17e forum des jeunes chercheurs (FJC).

13 avril 2011 - Dijon : Présentation d'un poster à la journée scientifique de l'IFR100.

Article 1

Hyperthermia restores apoptosis induced by death receptors through aggregation-induced c-FLIP cytosolic depletion

Morlé Aymeric¹, Garrido Carmen^{1,2} and Micheau Olivier^{1,2,3}

¹ INSERM, UMR866, Dijon, F-21079 France; Faculty of Medicine and Pharmacy, Univ. Bourgogne, Dijon, F-21079 France.

² Centre Georges-François Leclerc, Dijon, F-21000 France.

³ Correspondence should be addressed to: O Micheau, INSERM, U866, Dijon, F-21079 France; Faculty of Medicine and Pharmacy, Univ Bourgogne, Dijon, F-21079 France. Tel: +33 3 80393468; Fax: Tel: +33 3 80393434; E-mail: olivier.micheau@inserm.fr

Running Title : Hyperthermia blocks c-FLIP recruitment to the DISC

Abbreviations: BID, BH3 interacting-domain death agonist; CHX, cycloheximide; DD, death domain; DED, death effector domain; DISC, death-inducing signalling complex; DR, death receptor; FADD, Fas-associated death domain; FLIP, Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme-like inhibitory protein; HS, heat shock; HSP, heat shock protein; NF- κ B, nuclear factor- κ B; PARP, poly-(ADP-ribose) polymerase; RIP, receptor interacting protein; ROS, reactive oxygen species; SD, standard deviation; SDS, sodium dodecyl sulphate; siRNA, short interfering RNA; si-Nt, non-targeting siRNA molecule; TNF, tumour necrosis factor; TRAIL, tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; z-VAD-fmk, carboxybenzyl-VAD-fluoromethyl ketone

TRAIL is involved in immune tumor surveillance and is considered a promising anti-cancer agent owing to its limited side effects on healthy cells. However, some cancer cells display resistance, or become resistant to TRAIL-induced cell death. Hyperthermia can enhance sensitivity to TRAIL-induced cell death in various resistant cancer cell lines, including lung, breast, colon or prostate carcinomas. Mild heat shock treatment has been proposed to restore Fas ligand or TRAIL-induced apoptosis through c-FLIP degradation or the mitochondrial pathway. We demonstrate here that neither the mitochondria nor c-FLIP degradation are required for TRAIL-induced cell death restoration during hyperthermia. Our data provide evidence that insolubilisation of c-FLIP, alone, is sufficient to enhance apoptosis induced by death receptors. Hyperthermia induced c-FLIP depletion from the cytosolic fraction, without apparent degradation, thereby preventing c-FLIP recruitment to the TRAIL DISC and allowing efficient caspase-8 cleavage and apoptosis. Hyperthermia-induced c-FLIP depletion was independent of c-FLIP DED2 FL chain assembly motif or ubiquitination-mediated c-FLIP degradation, as assessed using c-FLIP point mutants on lysine 167 and 195 or threonine 166, a phosphorylation site known to regulate ubiquitination of c-FLIP. Rather, c-FLIP depletion was associated with aggregation, since addition of glycerol not only prevented loss of c-FLIP from the cytosol but enabled c-FLIP recruitment within the TRAIL DISC inhibiting thus TRAIL-induced apoptosis during hyperthermia.

Altogether our results demonstrate that c-FLIP is a thermosensitive protein whose targeting by hyperthermia allows restoration of apoptosis induced by TNF ligands, including TRAIL. Our findings suggest that combining TRAIL agonists with whole body or localized hyperthermia may be an interesting approach in cancer therapy.

Introduction :

TRAIL holds promise in the clinic owing to its anti-tumoral selectivity.¹ Evaluation of TRAIL or TRAIL derivatives in patients has however proved less efficient than anticipated.² Amongst the regulatory mechanisms that may explain TRAIL resistance, the cellular caspase-8 inhibitor, c-FLIP, which is highly expressed in a large variety of primary tumors and often associated with bad prognosis,^{3, 4, 5} is likely to play the most important role. Targeting c-FLIP for cancer therapy has clearly emerged as an important issue for cancer therapies. So far, three isoforms have been described. The long isoform, c-FLIP_L, composed of two death effector domains (DED) and a caspase-like domain devoid of the prototypic catalytic cysteine contained in pro-caspases,⁶ and two short isoforms, c-FLIP_S and c-FLIP_R, mainly composed of the two DEDs.⁷ Regardless of the isoform, c-FLIP proteins are co-recruited within the DISC of death domain (DD)-containing receptors of the TNF superfamily and prevent the release of active caspase-8 to the cytosol, inhibiting apoptosis induced by these death receptors.^{8, 9}

Expression levels of c-FLIP proteins are tightly regulated both transcriptionally and post-transcriptionally. At the transcriptional level, c-FLIP isoforms are repressed by a variety of transcription factors including E2F1 or c-Myc,^{10, 11} or induced by NF-κB.^{12, 13} Regulation of c-FLIP expression by NF-κB plays a central role in protecting cells from TNF-induced cell death.¹⁴ As such, this pro-inflammatory signaling pathway is likely to contribute to sustained expression of c-FLIP in primary tumors and to confer resistance to apoptosis-induced by death receptors. Accordingly, CD30 or CD40, two cytokines found in the tumoral microenvironment of follicular B-cell lymphomas, have been shown to induce c-FLIP expression up-regulation through NF-κB and to protect B-cell lymphomas from TRAIL-induced apoptosis.^{15, 16} At the post-translational level, c-FLIP proteins are mainly regulated through the ubiquitin-proteasomal pathway. These proteins are short-lived proteins. Ubiquitination of c-FLIP on lysines 167 or 195 induces its degradation by the proteasome.^{17, 18} Phosphorylation of c-FLIP can also lead to regulation of c-FLIP ubiquitination and degradation. Activation of PKC was shown to induce c-FLIP phosphorylation on serine 193 and to inhibit c-FLIP_S ubiquitination and degradation.¹⁹ More recently, ROS have been demonstrated to induce c-FLIP phosphorylation on threonine 166, leading to c-FLIP ubiquitination on lysine 167 and degradation by the proteasome.¹⁸ Several ubiquitin ligases were shown to contribute to c-FLIP ubiquitination including itch, c-Cbl and AIP4.^{20, 21, 22} Consistent with the increasing body of evidence demonstrating that a large number of stimuli lead to c-FLIP degradation and restoration of apoptosis induced by death receptors,⁷ hyperthermia has recently been proposed to restore TRAIL pro-apoptotic signaling pathway through ubiquitination of c-FLIP on K195.¹⁷

Herein, we provide evidence that proteosomal-mediated degradation of c-FLIP, albeit induced during hyperthermia, is not required for sensitization or restoration of TRAIL-induced cell death. Instead, our findings demonstrate that both c-FLIP isoforms are thermolabile proteins that aggregate during hyperthermia. As a consequence, c-FLIP proteins are not available in the cytosol and their recruitment within the TRAIL DISC is impaired, which allows efficient initiator caspase activation.

Results :

Hyperthermia restores TRAIL-induced apoptosis in a mitochondrial-independent manner.

Hyperthermia restores TRAIL-induced apoptosis in tumor cells^{17, 23, 24} but not in normal cells.²⁵ In line with these findings we found that incubating resistant cancer cell lines of various origin for 1 hour at 42°C (HS) in the presence of TRAIL followed by subsequent incubation at 37°C for 5 hours (Figure 1a), significantly increased apoptosis triggered by TRAIL as compared to a 6 hours incubation time at 37°C (Figure 1b). Incubation of the cells during the first hour at milder temperature, ie 39°C, or at 0°C failed to do so (Supplementary Figure 1a and b). As expected, incubating cells for 1 h at 42°C was sufficient to induce a time-dependent up-regulation of the main inducible HSPs including HSP27, α B-crystallin, HSP70 or HSP110 (Supplementary Figure 1c), phosphorylation of HSP27 on serine 15, 78 and 82, translocation of HSP27 into the non-ionic detergent insoluble fraction and to increase protein ubiquitination (Supplementary Figure 1d). However, as demonstrated in different cell lines, restoration of TRAIL pro-apoptotic activity by HS (Figure 1b) was not correlated with steady state differential expression levels of heat shock proteins (Supplementary Figure 2b) or TRAIL receptors but to some extent with c-FLIP expression levels (Supplementary Figure 2a and b). Likewise, regardless of their initial sensitivity to TRAIL (Supplementary Figure 2c), cells expressing high amounts of c-FLIP were more responsive to TRAIL-induced apoptosis during HS (Figure 1b) than cells expressing low levels (Supplementary Figure 2).

To understand the molecular mechanisms underlying the gain of function during hyperthermia, we decided to use the resistant mammary carcinoma cell line MDA-MB-231 as a model cell line. Cell death induced by TRAIL after a HS, was mainly driven by caspases since the pan-caspase inhibitor z-VAD totally abrogated apoptosis induced by TRAIL (Figure 1c) and rescued MDA-MB-231 clonogenic growth after TRAIL stimulation (Figure 1d). As evidenced by immunoblotting, hyperthermia enhanced initiator caspase-8, -9 and -10 processing, as compared to control conditions (37°C), both in the cytosolic and

the membrane-enriched fractions (Figure 1e). In agreement with this gain of function, higher amounts of RIP and PARP cleaved products were detected in HS samples (Figure 1e). Caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activation was increased by more than 2 fold after hyperthermia (Figure 1f). Consistent with this increase, hyperthermia was also able to enhance Fas ligand-induced apoptosis, but failed to increase apoptosis induced by the PKC-inhibitor staurosporine (Supplementary Figure 3a). This result suggests that the mitochondrial pro-apoptotic pathway is likely dispensable to restore TRAIL-induced cell death during HS. To test this hypothesis, caspase-9 or BID were silenced and sensitivity to TRAIL was assessed. While BID silencing attenuated TRAIL-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells at 37°C, it failed to inhibit apoptosis induced by TRAIL after a HS (Figure 1g). Loss of caspase-9 had no effect on in these cells, irrespective of the temperature (Figure 1g). Consistent with a lack of requirement for mitochondrial activation, ectopic expression of Bcl-xL only slightly attenuated TRAIL-induced cell death during HS as compared to Mock infected cells (Figure 1h). Moreover, restoration of TRAIL-induced cell death by HS was as efficient in the Bax-deficient prostate carcinoma cell line DU145 (Figure 1b), as in parental MDA-MB-231 cells pre-incubated with Bax channel blockers (Supplementary Figure 3b). By contrast and as expected, caspase-8 silencing completely abrogated apoptosis induced by TRAIL both at 37°C and after HS (Figure 1i), clearly indicating that reactivation of the mitochondrial pathway is dispensable for TRAIL pro-apoptotic signaling during HS.

Hyperthermia impedes c-FLIP recruitment to the TRAIL DISC.

Since the mitochondrial pathway is not a prerequisite for HS and TRAIL synergistic effect, and because it has been proposed that HS may act at the level of plasma membrane,²⁶ we decided to analyze TRAIL DISC composition and formation during and after HS. As shown Figure 2a, DISC immunoprecipitation using an anti-histidine antibody revealed that TRAIL DISC formation and composition were significantly different in cells incubated at 37°C as compared to cells incubated at 42°C. Strikingly, while c-FLIP was co-recruited with caspase-8 within the TRAIL DISC at 37°C, this caspase-8 inhibitor was not recruited at 42°C, even when cells were allowed to recover from the HS at 37°C for 30 or 60 minutes (Figure 2a). Consistently, a loss of c-FLIP/caspase-8 interaction was detected after caspase-8 immunoprecipitation in cells stimulated with TRAIL in HS condition (Figure 2b). In line with the gain of caspase activation and apoptosis induced by TRAIL after a HS, we observed an increase in caspase-8 and caspase-10 processing within the DISC, 120 minutes after TRAIL stimulation, as evidenced by their p43 and corresponding p18/p17 cleaved products, and the cleavage of RIP1 (Figure 2).

HSPs have mainly been described to inhibit apoptosis through their ability

to interfere with mitochondria.²⁷ However, a report suggested that HSP90 confers resistance to TRAIL-induced cell death through its ability to interact with c-FLIP and to increase c-FLIP recruitment within the DISC.²⁸ Analysis of HSP90 recruitment within the DISC indicated that some HSP90 could be detected at 37°C consistent with c-FLIP recruitment (Figure 2a). However, at 42°C and therefore in the absence of c-FLIP, albeit to a lesser extent, HSP90 was still detected in the DISC (Figure 2a). Moreover HSP90 was not observed at 37°C in the caspase-8 pull-down despite the presence of c-FLIP, but was detected 5 and 15 minutes after TRAIL stimulation at 42°C, a condition in which little c-FLIP remained associated with caspase-8 (Figure 2b). Contrary to HSP90, however, recruitment of HSP27 was consistently found in the TRAIL DISC at 42°C but not at 37°C (Figure 2b), and no HSP70 could be detected in the DISC, irrespective of the temperature (not shown).

To sort out whether the presence of HSP27 or HSP90 within the DISC might be relevant to the sensitizing potential of HS, these inducible HSPs were silenced by use of siRNAs and apoptosis induced by TRAIL was assessed. While silencing of HSP27 enhanced TRAIL-induced cell death both at 37°C and 42°C, silencing of HSP70, HSP90 α or HSP90 β had no significant effect, irrespective of the temperature (Supplementary Figure 3c and not shown). Silencing simultaneously both isoforms of HSP90, however, attenuated apoptosis induced by TRAIL during HS but not at 37°C (Supplementary Figure 3c and d). HSP90 is a chaperone of RIP1, and is known to stabilize this kinase.²⁹ To exclude the possibility that the effects of HSP90 α/β silencing might require RIP1, the kinase was silenced. Unlike HSP90 α/β , silencing of RIP1 was unable to alter TRAIL-induced cell death during HS (Supplementary Figure 3d), suggesting that HSP90's regulatory properties are independent of RIP1. Analysis of caspase activation by immunoblotting in MDA-MB-231 cells silenced for HSP27, HSP90 α/β or RIP1 demonstrated that these proteins are unable to regulate early events of TRAIL-induced cell death during HS (Supplementary Figure 3e). Neither caspase-8 nor c-FLIP cleavage was altered in cells lacking HSPs or RIP1, irrespective of the temperature. However, as expected, in cells silenced for HSP27, activation of caspase-9 and caspase-3 was significantly increased upon TRAIL stimulation, both at 37 and 42°C (Supplementary Figure 3e), indicating that HSP27 mainly inhibits TRAIL signaling at the mitochondrial level. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis after a HS in cells lacking HSP90 α/β was however not associated with apparent changes in caspase-9 activation, suggesting that HSP90 might act downstream mitochondria. Our results show that HSPs are not directly involved in regulating HS-induced TRAIL sensitization at the DISC level.

Hyperthermia induced c-FLIP insolubilisation occurs in an ubiquitination- and phosphorylation-independent manner and is not regulated c-FLIP DED2 chain assembly domain.

Hyperthermia has been proposed to induce ubiquitination-dependent c-FLIP degradation through the proteasome, allowing restoration of TRAIL- and mapatumumab-induced cell death.¹⁷ Analysis of c-FLIP expression in MDA-MB-231 stimulated with TRAIL during HS indicate that both c-FLIP isoforms remain highly expressed for up to 2 hours as evidenced in whole cell lysates (Figure 3a). We thus hypothesized that impairment of c-FLIP recruitment to TRAIL DISC during HS (Figure 2) is unlikely due to its mere degradation by the proteasome. In line with our hypothesis, while c-FLIP levels dropped after TRAIL treatment during HS in the detergent soluble fraction (Figure 3b), c-FLIP rapidly accumulated in the insoluble fraction (Figure 3b). Interestingly, caspase-8, caspase-10 and FADD were also found in the insoluble fraction. Yet, contrary to c-FLIP, a large proportion of caspase-10 and FADD, and to a lesser extent of caspase-8, remained in the soluble fraction 2 h after TRAIL stimulation (Figure 3b). Its high susceptibility to insolubility, most likely rendered c-FLIP unavailable for DISC recruitment and thus contributed to TRAIL-induced apoptosis restoration during HS. Accordingly, silencing of c-FLIP alone was sufficient to restore TRAIL-sensitivity to similar extent as cells exposed to a HS (Figure 3c), even at low TRAIL concentrations (Figure 3d). On the other hand, increasing c-FLIP levels, irrespective of the isoform, inhibited TRAIL-induced cell death, both at 37°C or after a HS (Figure 3e). The increase of c-FLIP expression in these cells was sufficient to maintain enough c-FLIP levels within the cytosol during the course of the HS (Figure 3f), allowing its recruitment within the TRAIL DISC, inhibition of caspase-8 activation (Figure 3g and Supplementary Figure 4a), and apoptosis (Figure 3e).

To exclude the possibility that loss of c-FLIP in the detergent insoluble fraction during HS required ubiquitination-mediated c-FLIP degradation,^{18, 30} point mutants targeting lysine 167 and 195 or threonine 166 were generated, and stably expressed in MDA-MB-231 cells, to monitor c-FLIP solubility by immunoblotting (Supplementary Figure 4b). Like WT c-FLIP, ubiquitinylable-deficient and phosphorylation c-FLIP mutants translocated to the detergent insoluble fraction upon HS, indicating that neither ubiquitination, nor regulation of ubiquitination through c-FLIP phosphorylation contributed to c-FLIP insolubility upon HS. Lysine 106 and serine 193 c-FLIP mutants were used here as negative controls for proteosomal mediated degradation.^{18, 19} Regardless of the point mutation, c-FLIP mutants were as efficient as WT c-FLIP in inhibiting TRAIL-induced cell death during HS (not shown), even after a 2 h incubation time at 42°C (Supplementary Figure 4c). Similar to WT c-FLIP, most of these mutants were expressed at high levels in MDA-MB-231 cells and a large proportion of c-FLIP mutants remained in the cytosol 60 minutes after HS, explaining their ability to inhibit TRAIL-induced cell death. Consistent with the demonstration that c-FLIP ubiquitination-mediated degradation is not required for depletion of c-FLIP from the cytosolic detergent soluble fraction, pre-incubation of MDA-MB-231 cells in the presence of MG132 failed to restore c-FLIP expression in the soluble fraction,

regardless of *de novo* protein synthesis, as shown using CHX (Supplementary Figure 4d). However, inhibition of the proteasome by MG132 led to accumulation of c-FLIP in the insoluble fraction, demonstrating that c-FLIP degradation occurs after its depletion from the cytosol. Insolubilisation of c-FLIP was also independent of c-FLIP DED2 chain assembly motif, since the two chain assembly motif mutants (F114G and F114G/L115G)^{31, 32} were as efficiently depleted from the cytosolic fraction as WT c-FLIP (Supplementary Figure 5a). At the contrary, depletion of FL114/115G c-FLIP mutant was even more pronounced than WT c-FLIP during HS. Interestingly, this mutant was less efficient than WT c-FLIP in inhibiting TRAIL-induced cell death upon HS (Supplementary Figure 5b), again indicating that depletion of c-FLIP from the cytosol, alone, is sufficient to restore TRAIL-induced cell death.

Restoration of c-FLIP in the cytosol enables c-FLIP recruitment to TRAIL DISC and inhibits apoptosis induced by TRAIL during HS.

Translocation of c-FLIP from the detergent soluble fraction to the insoluble fraction during HS was also found in other tumor cell lines of various origin (Figure 4a). As observed in MDA-MB-231, disappearance of c-FLIP from the soluble fraction in these cells was always more efficient than depletion of caspase-8 or caspase-10, suggesting that enough DISC component remains in the cytosol to allow efficient TRAIL-induced cell death in the absence of c-FLIP. In order to determine whether the mere increase in temperature is sufficient to induce c-FLIP aggregation and thus loss from the cytosol, cell lysates obtained from unstimulated MDA-MB-231 cells were incubated at 0°C, 37°C or 42°C for the indicated period of time, then centrifuged to separate NP40 soluble and insoluble fractions (Figure 4b) and samples were analyzed by immunoblotting. In cell extracts incubated at 42°C, c-FLIP content decreased in the soluble fraction in a time dependent-manner to accumulate in the insoluble fraction (Figure 4c). As expected, incubation of cell lysates at 0°C or 37°C for 60 minutes failed to induce c-FLIP depletion from the cytosolic fraction. Insolubilisation of c-FLIP, but also of initiator caspases, was most likely triggered through protein aggregation since addition of increasing amounts of glycerol in the cell lysates before incubation at 42°C reduced, in a dose dependent manner, the amount of c-FLIP and caspase-8 present in the insoluble fraction and restored significant c-FLIP protein content in the cytosolic fraction (Figure 4d). Addition of glycerol on intact cells prior to incubation at 42°C also inhibited HS-induced c-FLIP aggregation as evidenced by the increase of c-FLIP_L in the cytosolic fraction (Figure 4e). Since glycerol is able to prevent loss of c-FLIP from the cytosol we speculated that it might protect, at least partially, tumor cells from TRAIL-induced cell death after a HS. To address this question, MDA-MB-231 cells were incubated for 60 minutes in the presence of increasing amounts of glycerol before stimulation with TRAIL at 42°C. Analysis of apoptosis induced in these conditions indicates that addition of glycerol prior stimulation protected cells from TRAIL-induced apoptosis during

HS (Figure 4f) and restored c-FLIP recruitment to the TRAIL DISC (Figure 4g). Our results provide thus evidence that restoration of death receptor-induced cell death by hyperthermia is essentially mediated through c-FLIP aggregation.

DISCUSSION :

Hyperthermia was first demonstrated to restore cell death induced by $\text{TNF}\alpha$ *in vitro* and *in vivo* in the late 80's.^{33, 34} Only recently has hyperthermia been successfully exploited in the clinic in isolated limb or pelvic perfusion with $\text{TNF}\alpha$ to treat limb soft tissue sarcomas with high response rates,³⁵ or locally advanced cancers.³⁶ Besides $\text{TNF}\alpha$, hyperthermia can also promote Fas ligand and TRAIL-induced apoptosis.^{25, 37, 38} Accordingly, we show here that hyperthermia restores TRAIL pro-apoptotic signaling in a large panel of tumor cell lines. Yet, contrary to previous demonstrations pointing to a contribution of mitochondria,^{37, 39, 40, 41} our findings clearly demonstrate that the mitochondrial pathway is not a prerequisite since neither caspase-9-, Bid- or bax-deficiency nor Bcl-xL over-expression compromised TRAIL-induced cell death during HS.

Importantly, our results demonstrate that inhibition of c-FLIP recruitment within the TRAIL DISC is the main mechanism through which hyperthermia restores TRAIL-induced cell death. Accordingly, regardless of whether TRAIL DISC composition was analyzed by pulling down the recombinant exogenous TRAIL or the caspase-8, loss of c-FLIP recruitment within the DISC was always correlated with increased activation of initiator caspases. Moreover, over-expression of c-FLIP alone or inhibition of c-FLIP aggregation, using glycerol, was sufficient to restore c-FLIP recruitment within the DISC and to compromise TRAIL-induced apoptosis during HS.

c-FLIP is probably the most important regulator of apoptosis induced by death receptors.⁶ This caspase-8 inhibitor is highly regulated in normal and tumor cells,^{42, 43} and highly susceptible to a plethora of compounds, rendering c-FLIP an interesting target for cancer therapy.^{7, 44} Hyperthermia has recently been proposed to enhance TRAIL- and mapatumumab-induced cell death through FLIP degradation.¹⁷ While our results are in full agreement with the finding that c-FLIP is the main regulator targeted by hyperthermia allowing restoration of TRAIL sensitivity in resistant tumor cells, our data suggest that loss of c-FLIP within the TRAIL DISC is however not a direct consequence of its degradation, but rather of its aggregation and thereby its disappearance from the cytosol. Loss of c-FLIP from the cytosol was evidenced almost as early as 5 minutes after HS, much earlier than the onset of c-FLIP degradation or cleavage, which occurred after 90 to 120 minutes after HS. Depletion of c-FLIP from the cytosol also coincided with the loss of c-FLIP binding to caspase-8 after TRAIL DISC formation. Contrary to c-FLIP, however, caspase-8 was still recruited at 42°C, consistent with the gain

of pro-apoptotic function afforded by short incubation of the cancer cells at 42°C in the presence of TRAIL.

Moreover, despite the fact that the ubiquitin-proteasomal pathway emerges as an important regulator of c-FLIP expression in tumor cells,⁴⁵ our results demonstrate that neither phosphorylation or ubiquitination of c-FLIP nor inhibition of the proteasome inhibited c-FLIP depletion from the cytosol during hyperthermia, indicating that ubiquitination-mediated proteosomal degradation of c-FLIP is not required for its depletion from the cytosol.

However our results show that depletion of c-FLIP from the cytosol and its recovery in an insoluble cellular fraction after a heat shock is most likely triggered by its aggregation. Hyperthermia is known to induce protein aggregation, leading eventually to cell death.^{46, 47} In agreement with these findings, disappearance of c-FLIP but also, to a lesser extent, of initiator caspases including caspase-8 and caspase-10 from the non ionic detergent soluble fraction after hyperthermia was detected in all the tumor cell lines studied. However, contrary to the caspase-8 or the caspase-10, insolubilisation of c-FLIP led to full disappearance of the protein from the cytosol suggesting that c-FLIP may be more thermolabile than caspase-8 or caspase-10, or that complete depletion induced by HS is due to lower expression levels of c-FLIP, as compared to caspase-8 or FADD.³² Preferential depletion of c-FLIP was not due to its DED2 chain assembly motif, two amino acids found to be essential for FADD binding and recruitment to the TRAIL DISC,^{31, 32} suggesting that mere thermolability might be at work. Consistently, addition of glycerol, a compound shown to inhibit protein aggregation,⁴⁷ before hyperthermia prevented loss of c-FLIP from the cytosolic fraction, enabling c-FLIP recruitment within the TRAIL DISC, conferring partial protection to TRAIL-induced cell death.

Altogether our results provide the first demonstration that aggregation of c-FLIP induced by hyperthermia, but not degradation, impairs c-FLIP recruitment to TRAIL DISC and thus enhance or restores TRAIL-induced cell death in resistant cells through depletion of cytosolic c-FLIP reservoir. Keeping in mind that extensive research is being pursued worldwide to use TRAIL or TRAIL derivatives in the clinic and that c-FLIP isoforms are often highly expressed in tumor cells,⁷ inhibiting c-FLIP solubility with locally applied or whole-body hyperthermia could be relevant to cancer TRAIL-based therapies.^{2, 17}

Figure 1. Hyperthermia increases TRAIL induced cell death in a caspase-dependent but mitochondrial-independent manner.

(a) Schematic representation of the protocol used to stimulate cells with TRAIL. Cells were either stimulated at 37°C for 6 h, or incubated in the presence (T + HS) or absence (HS) of His-TRAIL for 1 h at 42°C followed by a 5 h additional incubation at 37°C. (b) Indicated cancer cell lines were stimulated with 500 ng/ml His-TRAIL (TRAIL) or TRAIL and hyperthermia (T + HS) as described above and apoptosis was measured after 6 h after the onset of the stimulation by hoechst staining. (c) MDA-MB-231 cells were pre-incubated or not 30 min with 5 μ M caspase inhibitor z-VAD and stimulated with 50 ng/ml His-TRAIL. Apoptosis was measured after 6 h by hoechst staining. (d) Five hundred MDA-MB-231 cells, plated overnight in a 6-well plate, were pre-incubated or not for 30 minutes with 20 μ M z-VAD prior stimulation or not with 500 ng/ml His-TRAIL at 37°C or in hyperthermic condition (HS) for 1 h and allowed to recover for a week at 37°C before staining with methylene blue. (e) MDA-MB-231 cells were stimulated or not with 500 ng/ml His-TRAIL as indicated for 2, 4 or 6 h and cytosolic or membrane fractions were isolated (see methods). Expression levels of indicated proteins were detected by immunoblotting. One representative blot is shown (n=3). (f) MDA-MB-231 cells were stimulated as described above with 50 ng/ml His-TRAIL and caspase activities were measured by luminometry 1 to 8 h after stimulation using caspase-3/7 (DEVD), caspase-8/10 (IETD) or caspase-9 (LEHD) luminogenic substrates. (g) MDA-MB-231 cells were transfected with non-targeting (si-Nt), Caspase-9 (si-C9) or BID (si-BID) targeting siRNAs. 72 h after transfection, cells were stimulated or not with 100 ng/ml His-TRAIL and apoptosis was analysed after 6 h by Annexin V staining and flow cytometry. Caspase-9 and BID expression levels are shown on the right. (h) MDA-MB-231 cells, transfected with an empty retroviral vector (Mock) or a vector encoding Bcl-xL, were stimulated as above and apoptosis induced by the indicated stimuli was analyzed by Hoechst. Bcl-xL expression is shown on the right. (i) MDA-MB-231 cells were transfected with a non-targeting (si-Nt) or Caspase-8 (si-C8) targeting siRNA, stimulated or not 72 h after transfection with 100 ng/ml His-TRAIL and apoptosis was analyzed as above. Caspase-8 expression levels were controlled by immunoblotting. (b, c, d, g, h and i) Error bars represent SD from at least 3 independent experiments.

Figure 2. Hyperthermia prevents FLIP recruitment to the TRAIL DISC.

(a) MDA-MB-231 cells, stimulated with 500 ng/ml His-TRAIL at 42°C and/or at 37°C for the indicated period of time, were lysed and the TRAIL DISC was immunoprecipitated using an anti-histidine antibody (see methods). DISC components associated with TRAIL were analyzed by immunoblotting as

indicated. (b) MDA-MB-231 cells were stimulated as above and the initiator caspase-8 was immunoprecipitated. TRAIL DISC components were analyzed by immunoblotting. Alternatively, an isotype control antibody (CTL-Ig) was used for specificity. NT stands for non-treated cell extracts. (a, b) One representative blot is shown (n=3). Black arrows show uncleaved proteins, white arrows indicate cleaved proteins. Grey arrow shows the short c-FLIP isoform.

Figure 3. Hyperthermia-mediated cytosolic c-FLIP depletion is sufficient to sensitize tumor cells to TRAIL apoptosis.

(a) MDA-MB-231 cells were treated with 500 ng/ml His-TRAIL or not (NT) for the indicated times and temperatures and c-FLIP expression was analysed from whole cell lysate (WCL) by immunoblotting together with caspase-8, -10 and FADD. HSC70 and HSP27 were used as loading and heat shock controls, respectively. Black arrows show uncleaved proteins, white arrows indicate cleaved proteins. Grey arrow shows the short c-FLIP isoform. (b) MDA-MB-231 cells were stimulated as above and lysed in NP40 1% lysis buffer. After centrifugation, the supernatants (Soluble) and the pellets resuspended in a buffer containing 1% SDS (Insoluble), were loaded and indicated proteins were analysed by immunoblotting. (c, d) MDA-MB-231 cells were transfected with non-targeting (si-Nt) or FLIP (si-FLIP) targeting siRNAs and stimulated 72 h after transfection with (c) 50 ng/ml or (d) increasing concentrations of His-TRAIL and apoptosis (Annexin V) was measured by flow cytometry. FLIP expression levels were controlled by immunoblotting. (e) MDA-MB-231 cells stably expressing c-FLIP_L or c-FLIP_S or infected with an empty vector (Mock) were stimulated with 50 ng/ml His-TRAIL as above and apoptosis (Annexin V) was measured by flow cytometry. FLIP expression levels were controlled by immunoblotting. (f) Stably expressing c-FLIP_L or Mock-infected MDA-MB-231 cells were stimulated or not (NT) as indicated with 500 ng/ml His-TRAIL for 15 to 120 minutes and expression of c-FLIP_L was analysed by immunoblotting in whole cell lysates (WCL), as well as cytosolic and insoluble NP40 detergent fractions, as described above. (g) MDA-MB-231 stably expressing c-FLIP_L, c-FLIP_S or mock-infected (Mock) cells were stimulated with 500 ng/ml His-TRAIL for 30 minutes at 37°C or at 42°C (T + HS) and caspase-8 was immunoprecipitated for analysis of TRAIL DISC composition by immunoblotting. (a, b, f, g) One representative blot is shown (n=3).

Figure 4. Hyperthermia-induced c-FLIP_{L/S} aggregation provokes c-FLIP depletion from the cytosol, thereby preventing its recruitment to the TRAIL DISC and enhancing apoptosis induced by TRAIL.

(a) The lung carcinoma A549, the liver adenocarcinoma SK-HEP1, and the two colon carcinoma SW480 and HCT116 cell lines were incubated or not (NT) at

42°C for 15 or 60 min and c-FLIP_L expression was analysed in NP40 soluble and insoluble fractions by immunoblotting. (b) Schematic representation of the cell fractionation experiment performed in (c). MDA-MB-231 cells were lysed in NP40. Extracts were then either incubated on ice (0°C) or at 37°C for 60 min, or incubated for 15 or 60 min at 42°C and soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation to analyse FLIP expression levels by immunoblotting. (d) MDA-MB-231 cells were lysed in NP40 and incubated or not at 42°C for the indicated times in the presence or absence of increasing amounts of glycerol (expressed here as % v/v). Expression levels of c-FLIP_L, caspase-8 and caspase-10 were analysed by immunoblotting. Actin was used as a loading control. (e) MDA-MB231 cells were pre-incubated for 60 min with increasing amounts of glycerol. Cells were then lysed in NP40 and cell extracts were incubated or not at 42°C for 30 minutes and centrifuged to collect the soluble and the insoluble NP40 fractions. c-FLIP and caspase-8 content was analysed by immunoblotting. (f) MDA-MB-231 cells were pre-incubated as above in the presence of 5% glycerol and stimulated or not 6 h in the presence of 50 ng/ml His-TRAIL at 37°C or 42°C (HS, see Figure 1a). Apoptosis (Annexin V) was measured by flow cytometry. (g) MDA-MB-231 cells were stimulated with 500 ng/ml His-TRAIL at 37°C or at 42°C (HS) in the presence or absence of glycerol (5% v/v) and TRAIL DISC was analyzed 2 h after the onset of the stimulation by immunoblotting after immunoprecipitation of the caspase-8. Black arrows show uncleaved proteins, white arrows indicate cleaved proteins. (a, c, d, e, g) One representative blot is shown (n=3).

Materials and Methods

Ligand production and chemicals

His-tagged TRAIL and FasL were produced and used as described previously.⁴⁸ Staurosporine, glycerol, nonidet P-40 (NP40) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France). Bax channel blocker was from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France). MG-132 (Cat# 1748) was from Tocris (Bristol, United Kingdom). The pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk and cycloheximide (Cat# ALX-380-269) were from EnzoLife Science (Villeurbanne, France).

Antibodies

For western blot analysis, anti-TRAIL-R1 (Cat# AB16955) and TRAIL-R2 (Cat# AB16942) were purchased from Chemicon (Millipore, Molsheim, France). Anti-FADD (Cat# 610400) and RIP1 antibodies (Cat# 551041) were obtained from Transduction Laboratories (BD biosciences, Le Pont de Claix, France). Anti-

caspase-8 (clone 5F7) and caspase-10 (clone 4C1) antibodies were obtained from Medical & Biological Laboratories (Clinisciences, Montrouge, France). Antibodies against BID (Cat# 2002), caspase-3 (clone 8G10), cleaved caspase-9 (clone Asp315), Histone H3 (clone D1H2), p-HSP27 S82 (clone D1H2), cleaved PARP (clone D65E10) and Vimentin (clone D21H3) were obtained from Cell Signaling (Millipore). Anti-caspase-8 (clone C20), GAPDH (clone 0411), HSC70 (clone B-6), TNFR1 (clone H5), and Ubiquitin (clone P4D1) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology. Anti-FLIP (clone 7F10), HSP27 (clone G3.1), Anti-p-HSP27 S15 (Cat# ADI-SPA-525), p-HSP27 S78 (Cat# ADI-SPA-523), HSP70 (clone C92F3A-5) and HSP90 β (clone K3705) antibodies were from EnzoLife Science. Anti-FLIP antibody (clone Dave-2) was from Adipogen (Coger, Paris, France). Anti-Bcl-xL (clone E18) and anti-HSP90 α (clone D7a) antibodies were purchased from ABCAM (ABCam, Paris, France). The anti-Histidine (clone AD1.1.10) was from AbD Serotec (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France). HRP-conjugated anti-rabbit or mouse antibodies were from Jackson ImmunoResearch (Interchim, Montluçon, France). HRP-conjugated anti-mouse IgG1, Ig2a and Ig2B specific antibodies were from Southern Biotech (Clinisciences). For flow cytometry experiments, the anti-TRAIL-R1 (clone wB-K32), and TRAIL-R2 (clone B-L27), TRAIL-R3 (clone wB-B44) and TRAIL-R4 (clone wB-P30) antibodies were kindly provided by Diaclone (Besançon, France). The secondary antibody was an Alexa-488 coupled-goat anti-mouse from Molecular Probes (Life technologies, Saint Aubin, France).

Cell culture

MDA-MB-231 (human mammary adenocarcinoma), A549 (human lung adenocarcinoma), SK-HEP-1 (human hepatocellular carcinoma), DU145 (human prostate adenocarcinoma) and the two human colon adenocarcinomas HCT116 and SW480 cell lines were cultured with high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM provided by Dutscher (Dutscher, Brumath, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Dutscher). PANC-1 (human pancreatic carcinoma) cell line was cultured RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) provided by Dutscher and supplemented with 10% fetal bovine serum. All these cell lines were grown in an incubator at 37°C and 5% CO₂.

Retrovirus production and cell transduction

The retroviral vector pBABE-puro encoding Bcl-xL was kindly provided by Dr Jerry Chipuk (Icahn Medical Institute, New York, NY), WT VSV tagged c-FLIP_L, and c-FLIP_S have previously been described.⁴⁹ Mutated VSV-FLIP_L were produced by site directed mutagenesis using pBABE-puro-WT-VSV-FLIP_L and the following primers : K106R forward 5'-GAG-ATT-GGT-GAG-GAT-TTG-GAT-AGA-TCT-GAT-GTG-TCC-TCA-TTA-AT-3' reverse 5'-ATT-AAT-GAG-GAC-ACA-TCA-GAT-CTA-TCC-AAA-TCC-TCA-CCA-ATC-TC-3'; T166A forward 5'-CAC-AGA-ATA-GAC-CTG-AAG-GCA-AAA-ATC-CAG-AAG-TAC-AAG-3' reverse 5'-CTT-GTA-CTT-CTG-GAT-TTT-TGC-CTT-CAG-GTC-TAT-TCT-GTG-3'; T166D

forward 5'-CAC-AGA-ATA-GAC-CTG-AAG-GAT-AAA-ATC-CAG-AAG-TAC-AAG-C-3' reverse 5'-GCT-TGT-ACT-TCT-GGA-TTT-TAT-CCT-TCA-GGT-CTA-TTC-TGT-G-3'; K167R forward 5'-CAG-AAT-AGA-CCT-GAA-GAC-ACG-AAT-CCA-GAA-GTA-CAA-GCA-G-3' reverse 5'-CTG-CTT-GTA-CTT-CTG-GAT-TCG-TGT-CTT-CAG-GTC-TAT-TCT-G-3'; T166A/K167R forward 5'-CCA-CAG-AAT-AGA-CCT-GAA-GGC-ACG-AAT-CCA-GAA-GTA-CAA-GCA-G-3' reverse 5'-CTG-CTT-GTA-CTT-CTG-GAT-TCG-TGC-CTT-CAG-GTC-TAT-TCT-GTG-G-3'; T166D/K167R forward 5'-CAC-AGA-ATA-GAC-CTG-AAG-GAT-CGA-ATC-CAG-AAG-TAC-AAG-CAG-3' reverse 5'-CTG-CTT-GTA-CTT-CTG-GAT-TCG-ATC-CTT-CAG-GTC-TAT-TCT-GTG-3'; S193A forward 5'-GCA-GCA-ATC-CAA-AAG-GCT-CTC-AAG-GAT-CCT-TCA-AAT-AAC-3' reverse 5'-GTT-ATT-TGA-AGG-ATC-CTT-GAG-AGC-CTT-TTG-GAT-TGC-TGC-3'; S193D forward 5'-GCA-GCA-ATC-CAA-AAG-GAT-CTC-AAG-GAT-CCT-TCA-AAT-AAC-3' reverse 5'-GTT-ATT-TGA-AGG-ATC-CTT-GAG-ATC-CTT-TTG-GAT-TGC-TGC-3'; K195R forward 5'-CAA-GCA-GCA-ATC-CAA-AAG-AGT-CTC-AGG-GAT-CCT-TCA-AAT-3' reverse 5'-ATT-TGA-AGG-ATC-CCT-GAG-ACT-CTT-TTG-GAT-TGC-TGC-TTG-3'; F114G forward 5'-TCT-GAT-GTG-TCC-TCA-TTA-ATT-GGC-CTC-ATG-AAG-GAT-TAC-ATG-GGC-3' reverse 5'-GCC-CAT-GTA-ATC-CTT-CAT-GAG-GCC-AAT-TAA-TGA-GGA-CAC-ATC-AGA-3'; F114G/L115G forward 5'-TCT-GAT-GTG-TCC-TCA-TTA-ATT-GGC-GGC-ATG-AAG-GAT-TAC-ATG-GGC-3' reverse 5'-GCC-CAT-GTA-ATC-CTT-CAT-GGG-CGG-AAT-TAA-TGA-GGA-CAC-ATC-AGA-3'. All constructs were checked by sequencing and used to generate stably expressing FLIP_L mutants as follows. Cells were transduced for 16 h with viral supernatants containing polybrene (8 mg/ml), washed in PBS, and cultured in complete medium containing puromycin (2.5 µg/ml) obtained from Invivogen (Invivogen, Toulouse, France).

Treatments with hyperthermia and TRAIL

Cells were treated with the indicated concentration of His-TRAIL in supplemented DMEM and heated at 42°C for 1h or the indicated time in a preheated water bath or at 37°C in an incubator. Cells were then incubated for 5 h or the indicated time with 5% CO₂ at 37°C before analysis.

Hoechst analysis

Apoptosis was assessed by Hoechst staining (20 µg/ml) and determination of the percentage of condensed and/or fragmented nuclei from at least 300 cells per conditions on 3 different fields. Experiments were repeated at least three times.

Annexin V analysis

Annexin V-FITC staining kit was purchased from Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec, Paris, France) and used according to the manufacturer's instructions. Stained cells were analysed with a BD LSR2 flow cytometer (BD biosciences). The percentage of Annexin V-positive cells was calculated as the number of cells

dem`nstrating Annexin V staining (PI negative `r p` sitive) divided by the t` tal number `f cells examined. Experiments were repeated at least three times.

Caspases activity analysis

10³ cells were implanted in 96-well plates. 24 h after, cells were stimulated with 50 ng/ml His-TRAIL at 37°C f`r the indicated time. Alternatively, cells were stimulated with TRAIL at 42°C f`r 1 h then were incubated `r n` t at 37°C f`r the remaining time (1 t` 7 h), bef`re caspase activity analysis. Caspases -3/-7 (DEVDase, Cat# G8090), Caspase-8 (IETDase, Cat# G8200) and Caspase-9 (LHDase, Cat# G8210) activities were measured by lumin`metry with a c`mmercial kit `btained fr`m Pr`mega (Pr`mega France, Charb`nni`re, France) acc`rding t` the manufacturer's pr`t`c`l. Experiments were repeated at least three times.

Gene silencing by siRNA.

siRNA have been transfected with Interferin purshased fr`m P`lyplus (P`lyplus transfecti`n, Illkirch, France), acc`rding t` the manufacturer's pr`t`c`l. siRNA directed against BID (Cat# L-004387-00), Caspase-9 (Cat# L-003309-00), Caspase-8 (Cat# L-003466-00), HSP90A (Cat# L-005186-00), HSP90B (Cat# L-005187-00), RIP1 (Cat# L-004445-00), FLIP (Cat# L-003772-00) and n`n-targeting (Cat# L-001810-10-05) were `btained fr`m Dharmac`n (Enz`life science). siRNA directed against HSP27 (Cat# AM16708) was purchased fr`m Ambi`n (Life techn`l`gies). siRNA directed against HSP70 (Cat# SASI_Hs01_00051449) was purchased fr`m Sigma-Aldrich.

Immunoprecipitation

F`r DISC analysis, 50 x 10⁶ MDA-MB-231 cells per T175 cm² flasks were stimulated with 12 ml `f supplemented DMEM c`ntaining 500 ng/ml His-TRAIL f`r the indicated time and temperature. Cells were then washed with c`ld PBS, snap fr`zen and lysed with 1 ml lysis buffer c`ntaining 1% NP40, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 10% glycer`l. Lysates were pre-cleared with Sephar`se 6B (Sigma-Aldrich) f`r 1 h at 4°C with `n a r`tating wheel and then immun`precipitated `vernight with G-pr`tein Sephar`se beads (Cat# 17-0618-01, GE Healthcare, Dutscher) in the presence `f 2 µg `f anti-Histidine, Caspase-8 (cl`ne C20) `r c`rresp`nding Ig is`type c`ntr`l (CTL-Ig). Beads were then washed three times with 1x lysis buffer, and immun`precipitates were eluted with SDS gel l`ading buffer (Tris-HCl 63 mM, SDS 1%, phen`l red 0.03%, glycer`l 10% and DTT 100 mM `f pH6.8), b`iled f`r 5 min and pr`cessed f`r immun`bl`tting.

Lysates and fractionation

Cells were treated as indicated and washed in c`ld PBS. Wh`le cell lysis was perf`rmed using the SDS gel l`ading buffer. Samples were s`nicated and b`iled

for 5 min before loading and immunoblotting analysis. For soluble/insoluble fractionation experiments, cells were lysed for 20 min on ice in a non ionic detergent containing buffer composed of 1% NP40, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 10% glycerol. Lysates were then centrifuged 12 min at 10 000 rcf and supernatants (soluble fraction) or the pellet (insoluble fraction) were recovered in 1x final concentration of SDS gel loading buffer and processed as above for immunoblot analysis. Alternatively, for glycerol studies, NP40 containing lysis buffer was used without or with increasing concentrations of glycerol as indicated.

Western blotting

Immunoprecipitates or cell lysates obtained from WCL or cell fractionation were resolved by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Amersham, Biosciences, Les Ullis, France). Nonspecific binding sites were blocked by incubating membranes for 1 h in PBS containing 0.01% of Tween 20 and 5% (w/v) dried skimmed milk (PBS-Tm). Immunoblots were then incubated with specific primary antibody diluted in PBS-Tm for 2 h at room temperature or overnight at 4°C, washed three times in PBS-T for 10 minutes. Membranes were then incubated with corresponding HRP-conjugated secondary antibody in PBS-T for 1 h and washed three times followed by a chemiluminescence detection with the Western Bright Quantum kit (Advansta, Menlo Park, CA). Protein expression levels were detected with ChemiDoc MP gel imager (Bio-Rad) or using x-ray films.

Acknowledgment

This work is supported by grants from the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC Labex, the Conseil Regional de Bourgogne, the INCa (Institut National du Cancer, PLBIO14-007) and the ANR (Agence Nationale de la Recherche, 07-PCV-0031 and SphingoDR). A.M. was supported by fellowships from the Ministry of Research and Education and the Ligue Nationale Contre le Cancer. We are indebted to Dr Jerry Chipuk (Icahn Medical Institute, New York, NY) for the pBabe-Bcl-xL retroviral vector and Dr Patrick Legembre, (INSERM U1085, Rennes, France) for MDA-MB-231 cells.

1. Yang A, Wilson NS, Ashkenazi A. Proapoptotic DR4 and DR5 signaling in cancer cells: toward clinical translation. *Curr Opin Cell Biol* 2010, **22**(6): 837-844.
2. Micheau O, Shirley S, Dufour F. Death receptors as targets in cancer. *British Journal of Pharmacology* 2013, **169**(8): 1723-1744.
3. McLornan DP, Barrett HL, Cummins R, McDermott U, McDowell C, Conlon SJ, *et al.* Prognostic significance of TRAIL signaling molecules in stage II and III colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2010, **16**(13): 3442-3451.
4. McLornan D, Hay J, McLaughlin K, Holohan C, Burnett AK, Hills RK, *et al.* Prognostic and therapeutic relevance of c-FLIP in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2013, **160**(2): 188-198.
5. Riley JS, Hutchinson R, McArt DG, Crawford N, Holohan C, Paul I, *et al.* Prognostic and therapeutic relevance of FLIP and procaspase-8 overexpression in non-small cell lung cancer. *Cell death & disease* 2013, **4**: e951.
6. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, *et al.* Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997, **388**(6638): 190-195.
7. Shirley S, Micheau O. Targeting c-FLIP in cancer. *Cancer Lett* 2010.
8. Ueffing N, Keil E, Freund C, Kuhne R, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Mutational analyses of c-FLIPR, the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment. *Cell Death Differ* 2008, **15**(4): 773-782.
9. Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ* 2012, **19**(1): 36-41.
10. Salon C, Eymin B, Micheau O, Chaperot L, Plumas J, Brambilla C, *et al.* E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ* 2006, **13**(2): 260-272.
11. Ricci MS, Jin Z, Dews M, Yu D, Thomas-Tikhonenko A, Dicker DT, *et al.* Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol Cell Biol* 2004, **24**(19): 8541-8555.

12. Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 2001, **21**(12): 3964-3973.
13. Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 2001, **21**(16): 5299-5305.
14. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003, **114**(2): 181-190.
15. Travert M, Ame-Thomas P, Pangault C, Morizot A, Micheau O, Semana G, *et al.* CD40 ligand protects from TRAIL-induced apoptosis in follicular lymphomas through NF-kappaB activation and up-regulation of c-FLIP and Bcl-xL. *J Immunol* 2008, **181**(2): 1001-1011.
16. Braun FK, Hirsch B, Al-Yacoub N, Durkop H, Assaf C, Kadin ME, *et al.* Resistance of cutaneous anaplastic large-cell lymphoma cells to apoptosis by death ligands is enhanced by CD30-mediated overexpression of c-FLIP. *J Invest Dermatol* 2010, **130**(3): 826-840.
17. Song X, Kim SY, Zhou Z, Lagasse E, Kwon YT, Lee YJ. Hyperthermia enhances mapatumumab-induced apoptotic death through ubiquitin-mediated degradation of cellular FLIP(long) in human colon cancer cells. *Cell death & disease* 2013, **4**: e577.
18. Wilkie-Grantham RP, Matsuzawa S, Reed JC. Novel phosphorylation and ubiquitination sites regulate reactive oxygen species-dependent degradation of anti-apoptotic c-FLIP protein. *The Journal of biological chemistry* 2013, **288**(18): 12777-12790.
19. Kaunisto A, Kochin V, Asaoka T, Mikhailov A, Poukkula M, Meinander A, *et al.* PKC-mediated phosphorylation regulates c-FLIP ubiquitylation and stability. *Cell Death Differ* 2009, **16**(9): 1215-1226.
20. Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, *et al.* The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 2006, **124**(3): 601-613.
21. Kundu M, Pathak SK, Kumawat K, Basu S, Chatterjee G, Pathak S, *et al.* A TNF- and c-Cbl-dependent FLIP(S)-degradation pathway and its function in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage apoptosis. *Nat Immunol* 2009, **10**(8): 918-926.
22. Panner A, Crane CA, Weng C, Feletti A, Parsa AT, Pieper RO. A novel PTEN-dependent link to ubiquitination controls FLIPS stability and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme. *Cancer research* 2009, **69**(20): 7911-7916.

23. Moulin M, Dumontet C, Arrigo AP. Sensitization of chronic lymphocytic leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis by hyperthermia. *Cancer Lett* 2007, **250**(1): 117-127.
24. Moulin M, Arrigo AP. Caspases activation in hyperthermia-induced stimulation of TRAIL apoptosis. *Cell stress & chaperones* 2008, **13**(3): 313-326.
25. Moulin M, Arrigo AP. Long lasting heat shock stimulation of TRAIL-induced apoptosis in transformed T lymphocytes. *Exp Cell Res* 2006, **312**(10): 1765-1784.
26. Moulin M, Carpentier S, Levade T, Arrigo AP. Potential roles of membrane fluidity and ceramide in hyperthermia and alcohol stimulation of TRAIL apoptosis. *Apoptosis* 2007, **12**(9): 1703-1720.
27. Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, *et al.* Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature cell biology* 2000, **2**(9): 645-652.
28. Panner A, Murray JC, Berger MS, Pieper RO. Heat shock protein 90alpha recruits FLIPS to the death-inducing signaling complex and contributes to TRAIL resistance in human glioma. *Cancer research* 2007, **67**(19): 9482-9489.
29. Lewis J, Devin A, Miller A, Lin Y, Rodriguez Y, Neckers L, *et al.* Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* 2000, **275**(14): 10519-10526.
30. Song X, Kim SY, Lee YJ. Evidence for two modes of synergistic induction of apoptosis by mapatumumab and oxaliplatin in combination with hyperthermia in human colon cancer cells. *PLoS One* 2013, **8**(8): e73654.
31. Dickens LS, Boyd RS, Jukes-Jones R, Hughes MA, Robinson GL, Fairall L, *et al.* A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Molecular cell* 2012, **47**(2): 291-305.
32. Majkut J, Sgobba M, Holohan C, Crawford N, Logan AE, Kerr E, *et al.* Differential affinity of FLIP and procaspase 8 for FADD's DED binding surfaces regulates DISC assembly. *Nature communications* 2014, **5**: 3350.
33. Maeda T, Fuchimoto S, Orita K. Hyperthermic enhancement of the antitumor effect of natural human tumor necrosis factor-alpha and -beta: an in vitro and in vivo study. *Japanese journal of cancer research : Gann* 1988, **79**(9): 1054-1061.

34. Tomasovic SP, Barta M, Klostergaard J. Temporal dependence of hyperthermic augmentation of macrophage-TNF production and tumor cell-TNF sensitization. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 1989, **5**(5): 625-639.
35. Bonvalot S, Rimareix F, Causeret S, Le Pechoux C, Boulet B, Terrier P, *et al.* Hyperthermic isolated limb perfusion in locally advanced soft tissue sarcoma and progressive desmoid-type fibromatosis with TNF 1 mg and melphalan (T1-M HILP) is safe and efficient. *Annals of surgical oncology* 2009, **16**(12): 3350-3357.
36. Bonvalot S, de Baere T, Mendiboure J, Paci A, Farace F, Drouard-Troalen L, *et al.* Hyperthermic pelvic perfusion with tumor necrosis factor-alpha for locally advanced cancers: encouraging results of a phase II study. *Annals of surgery* 2012, **255**(2): 281-286.
37. Hermisson M, Wagenknecht B, Wolburg H, Glaser T, Dichgans J, Weller M. Sensitization to CD95 ligand-induced apoptosis in human glioma cells by hyperthermia involves enhanced cytochrome c release. *Oncogene* 2000, **19**(19): 2338-2345.
38. Tran SE, Meinander A, Holmstrom TH, Rivero-Muller A, Heiskanen KM, Linnau EK, *et al.* Heat stress downregulates FLIP and sensitizes cells to Fas receptor-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 2003, **10**(10): 1137-1147.
39. Yuen WF, Fung KP, Lee CY, Choy YM, Kong SK, Ko S, *et al.* Hyperthermia and tumour necrosis factor-alpha induced apoptosis via mitochondrial damage. *Life Sci* 2000, **67**(6): 725-732.
40. Klostergaard J, Leroux ME, Auzenne E, Khodadadian M, Spohn W, Wu JY, *et al.* Hyperthermia engages the intrinsic apoptotic pathway by enhancing upstream caspase activation to overcome apoptotic resistance in MCF-7 breast adenocarcinoma cells. *J Cell Biochem* 2006, **98**(2): 356-369.
41. Ko S, Yuen WF, Fung KP, Lee CY, Choy YM, Cheng HK, *et al.* Reversal of TNF-alpha resistance by hyperthermia: role of mitochondria. *Life Sci* 2000, **67**(25): 3113-3121.
42. Algeciras-Schimmich A, Griffith TS, Lynch DH, Paya CV. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 1999, **162**(9): 5205-5211.
43. Wang J, Lobito AA, Shen F, Hornung F, Winoto A, Lenardo MJ. Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP. *Eur J Immunol* 2000, **30**(1): 155-163.

44. Micheau O. Cellular FLICE-inhibitory protein: an attractive therapeutic target? *Expert opinion on therapeutic targets* 2003, **7**(4): 559-573.
45. Fukazawa T, Fujiwara T, Uno F, Teraishi F, Kadowaki Y, Itoshima T, *et al.* Accelerated degradation of cellular FLIP protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells. *Oncogene* 2001, **20**(37): 5225-5231.
46. Rosenberg B, Kemeny G, Switzer RC, Hamilton TC. Quantitative evidence for protein denaturation as the cause of thermal death. *Nature* 1971, **232**(5311): 471-473.
47. Dubois MF, Hovanessian AG, Bensaude O. Heat-shock-induced denaturation of proteins. Characterization of the insolubilization of the interferon-induced p68 kinase. *The Journal of biological chemistry* 1991, **266**(15): 9707-9711.
48. Schneider P. Production of recombinant TRAIL and TRAIL receptor: Fc chimeric proteins. *Methods Enzymol* 2000, **322**: 325-345.
49. Morizot A, Merino D, Lalaoui N, Jacquemin G, Granci V, Iessi E, *et al.* Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level. *Cell Death Differ* 2011, **18**(4): 700-711.

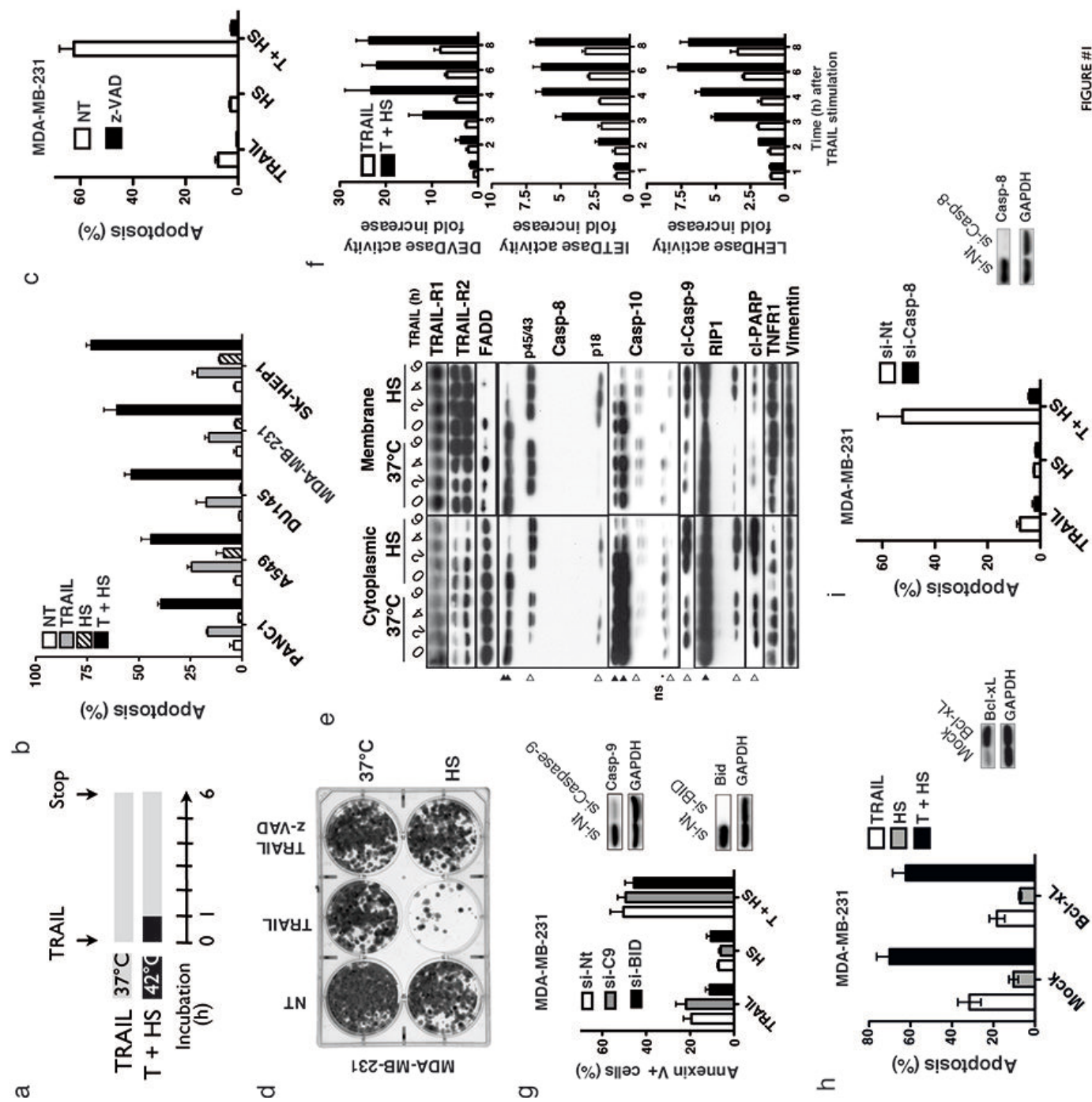
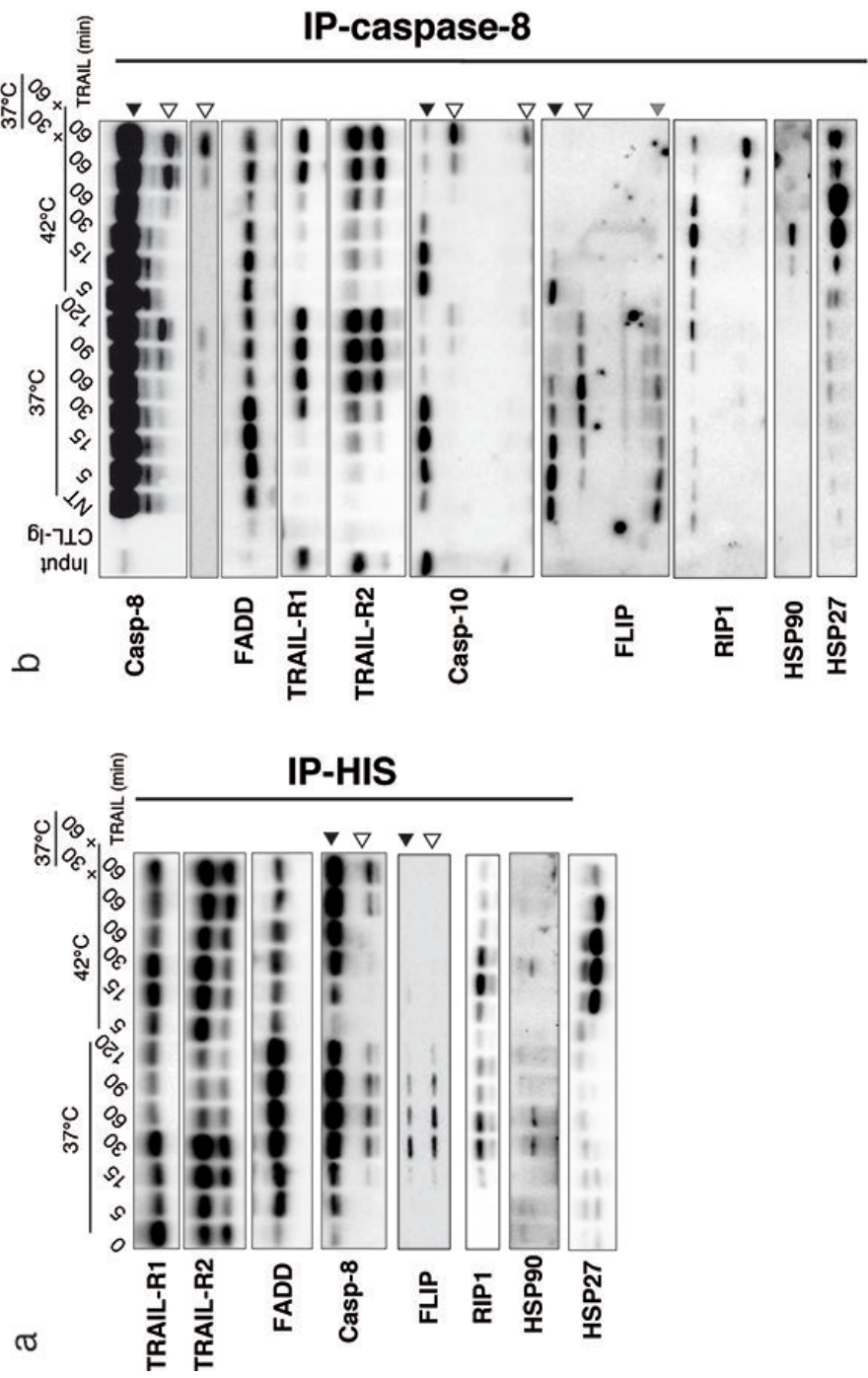


FIGURE #1



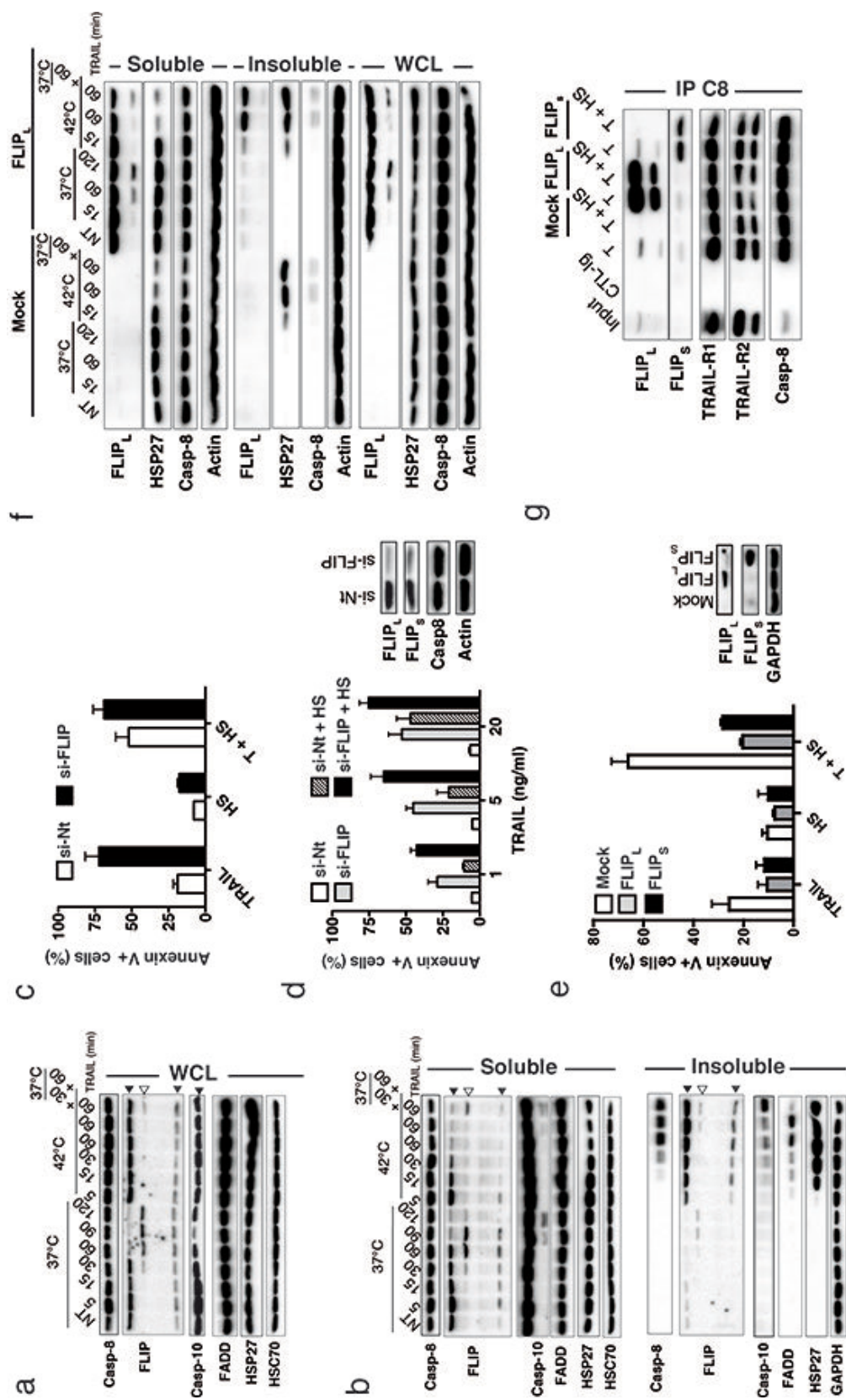


FIGURE #3

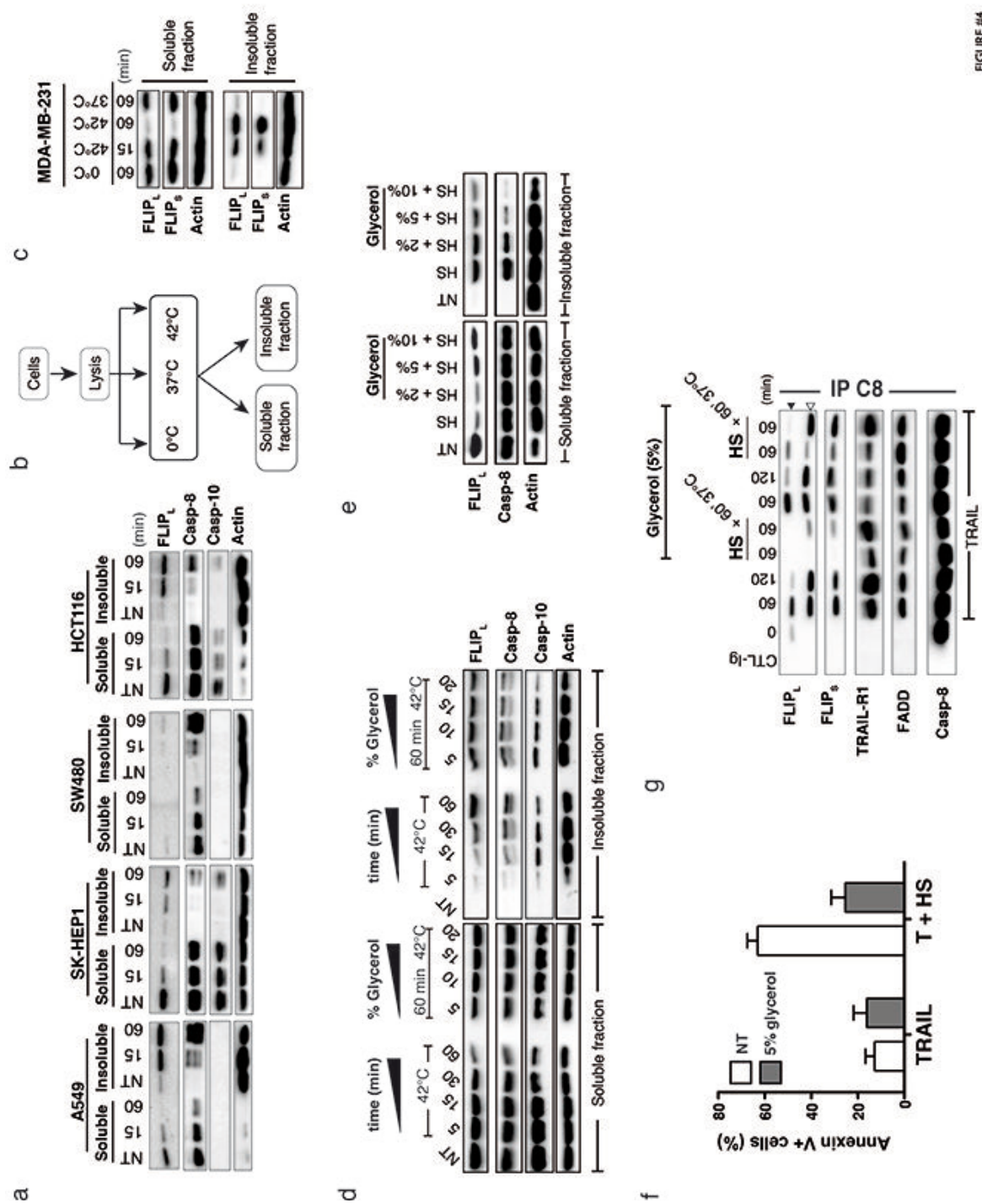


FIGURE #4

TRAIL-R4 Promotes Tumor Growth and Resistance to Apoptosis in Cervical Carcinoma HeLa Cells through AKT

Najoua Lalaoui^{1,2}, Aymeric Morlé^{1,2}, Delphine Mérino^{1,2}, Guillaume Jacquemin^{1,2}, Elisabetta Iessi^{1,2}, Alexandre Morizot^{1,2}, Sarah Shirley^{1,2}, Bruno Robert^{3,4}, Eric Solary^{5,6}, Carmen Garrido^{1,2,7}, Olivier Micheau^{1,2,8*}

1 U866, INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), Dijon, France, **2** Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Bourgogne, Dijon, France, **3** Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), U896, INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), Montpellier, France, **4** CRLC Val d'Aurelle-Paul Lamarque, Université Montpellier1, Montpellier, France, **5** U1009, INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), Villejuif, France, **6** Institut Gustave Roussy, Univ. Paris XI, Villejuif, France, **7** Centre Hospitalier Universitaire Dijon, Dijon, France, **8** Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

Abstract

Background: TRAIL/Apo2L is a pro-apoptotic ligand of the TNF family that engages the apoptotic machinery through two pro-apoptotic receptors, TRAIL-R1 and TRAIL-R2. This cell death program is tightly controlled by two antagonistic receptors, TRAIL-R3 and TRAIL-R4, both devoid of a functional death domain, an intracellular region of the receptor, required for the recruitment and the activation of initiator caspases. Upon TRAIL-binding, TRAIL-R4 forms a heteromeric complex with the agonistic receptor TRAIL-R2 leading to reduced caspase-8 activation and apoptosis.

Methodology/Principal Findings: We provide evidence that TRAIL-R4 can also exhibit, in a ligand independent manner, signaling properties in the cervical carcinoma cell line HeLa, through Akt. Ectopic expression of TRAIL-R4 in HeLa cells induced morphological changes, with cell rounding, loss of adherence and markedly enhanced cell proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo*. Disruption of the PI3K/Akt pathway using the pharmacological inhibitor LY294002, siRNA targeting the p85 regulatory subunit of phosphatidylinositol-3 kinase, or by PTEN over-expression, partially restored TRAIL-mediated apoptosis in these cells. Moreover, the Akt inhibitor, LY294002, restituted normal cell proliferation index in HeLa cells expressing TRAIL-R4.

Conclusions/Significance: Altogether, these results indicate that, besides its ability to directly inhibit TRAIL-induced cell death at the membrane, TRAIL-R4 can also trigger the activation of signaling pathways leading to cell survival and proliferation in HeLa cells. Our findings raise the possibility that TRAIL-R4 may contribute to cervical carcinogenesis.

Citation: Lalaoui N, Morlé A, Mérino D, Jacquemin G, Iessi E, et al. (2011) TRAIL-R4 Promotes Tumor Growth and Resistance to Apoptosis in Cervical Carcinoma HeLa Cells through AKT. PLoS ONE 6(5): e19679. doi:10.1371/journal.pone.0019679

Editor: Frederic Rieux-Laucat, Pavillon Kirmisson, France

Received: December 14, 2010; **Accepted:** April 13, 2011; **Published:** May 20, 2011

Copyright: © 2011 Lalaoui et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work is supported by grants of the Conseil Regional de Bourgogne, the INCa (Institut National du Cancer) Canceropole Grand-Est, (Agence Nationale de la Recherche, ANR-06-JCJC-0103 and 07-PCV-0031) and the European Community (ApopTrain Marie Curie RTN). NL, A. Morizot, DM, A. Morlé and GJ are supported by fellowships from the Ligue Nationale contre le Cancer, the Ministry of Research and Education, the ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), the INSERM and the Conseil Regional de Bourgogne. EI was supported by a fellowship from the ApoptTrain Marie Curie RTN. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: omicheau@u-bourgogne.fr

Introduction

TRAIL/Apo2L is regarded as a promising anticancer agent for cancer therapy and is currently being evaluated in clinical trials [1]. TRAIL binds to four membrane-anchored receptors: TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5, Killer, TRICK), TRAIL-R3 (DcR1, LIT, TRID) or TRAIL-R4 (DcR2, TRUND), and one soluble receptor, osteoprotegerin (OPG) [1]. TRAIL induces cell death through its interaction with either TRAIL-R1 or TRAIL-R2. These two agonistic receptors harbor, within their cytoplasmic region, a relatively small amino acid stretch called the death domain (DD), which is necessary and sufficient to transduce the death signal [2]. Activation of TRAIL-R1 or TRAIL-R2 by trimeric TRAIL induces the recruitment of the adaptor protein FADD (Fas-associated death domain protein) *via* homotypic interactions with their respective DD, allowing in turn the

recruitment of the initiator caspases, procaspases-8 and -10 [3,4], leading to the formation of the death-inducing signaling complex (DISC) [5]. Within the DISC, the initiator caspases-8 and -10 undergo catalytic cleavage inducing their release to the cytosol and the triggering of the caspase cascade that ultimately leads to apoptosis. In contrast, TRAIL binding to TRAIL-R3 or TRAIL-R4 fails to induce the apoptotic machinery because none of these receptors harbor a functional DD [6]. TRAIL-R3 is anchored to the membrane via its glycosyl-phosphatidylinositol tail (GPI), whereas TRAIL-R4 is addressed to the cell surface through a transmembrane domain but includes a truncated DD that is unable to recruit the adaptor protein FADD [7].

Expression of TRAIL-R3 or TRAIL-R4 confers resistance to TRAIL-induced cell death in several tumor cell lines and primary tumors [8,9,10,11,12,13]. These antagonistic receptors, coined “decoy receptors”, were initially proposed to act as competitors to

TRAIL-R1 and TRAIL-R2 for TRAIL binding [14]. However, we and others have provided evidence that TRAIL-R4 should rather be considered as a regulatory receptor, because TRAIL-R4 is able to interact with TRAIL-R2 within the TRAIL DISC and to impair caspase-8 activation [10,12,15]. In this study, we provide new evidence that TRAIL-R4 exhibits a TRAIL-independent signaling activity that gives rise to oncogenic-like properties in HeLa cells, mainly through the activation of Akt.

Results

TRAIL-R4 ectopic expression in HeLa cells markedly changes cell morphology, cell proliferation and tumor growth

Ectopic TRAIL-R4 expression to physiological levels in HeLa cells (Figure 1A), as well as in other tumors [15], by use of retroviral vectors, affords good selective protection against

TRAIL-induced cell death, but not Fas ligand (Figure 1B and C). Strikingly, HeLa cells expressing TRAIL-R4 (H-TRAIL-R4) undergo drastic morphological changes including cell rounding and loss of adherence (Figure 1D). As compared to control cells (H-Ctl) infected with an empty vector, H-TRAIL-R4 cells exhibited a higher proliferative index (Figure 1E). This increase in cell proliferation is however most likely independent of TRAIL itself, since the recombinant fusion protein Fc-TRAIL-R2 failed to affect proliferation in H-TRAIL-R4 cells (Figure S1A). In agreement with these findings, TRAIL levels were undetectable in the supernatant or at the surface of H-TRAIL-R4 cells (not shown). The drastic changes in cell morphology and proliferative status prompted us to check whether TRAIL-R4 overexpression confers tumor growth advantage *in vivo*. Parental (H-Ctl) and TRAIL-R4 expressing cells (H-TRAIL-R4) were implanted into nude mice in the left and the right flank, respectively of the same

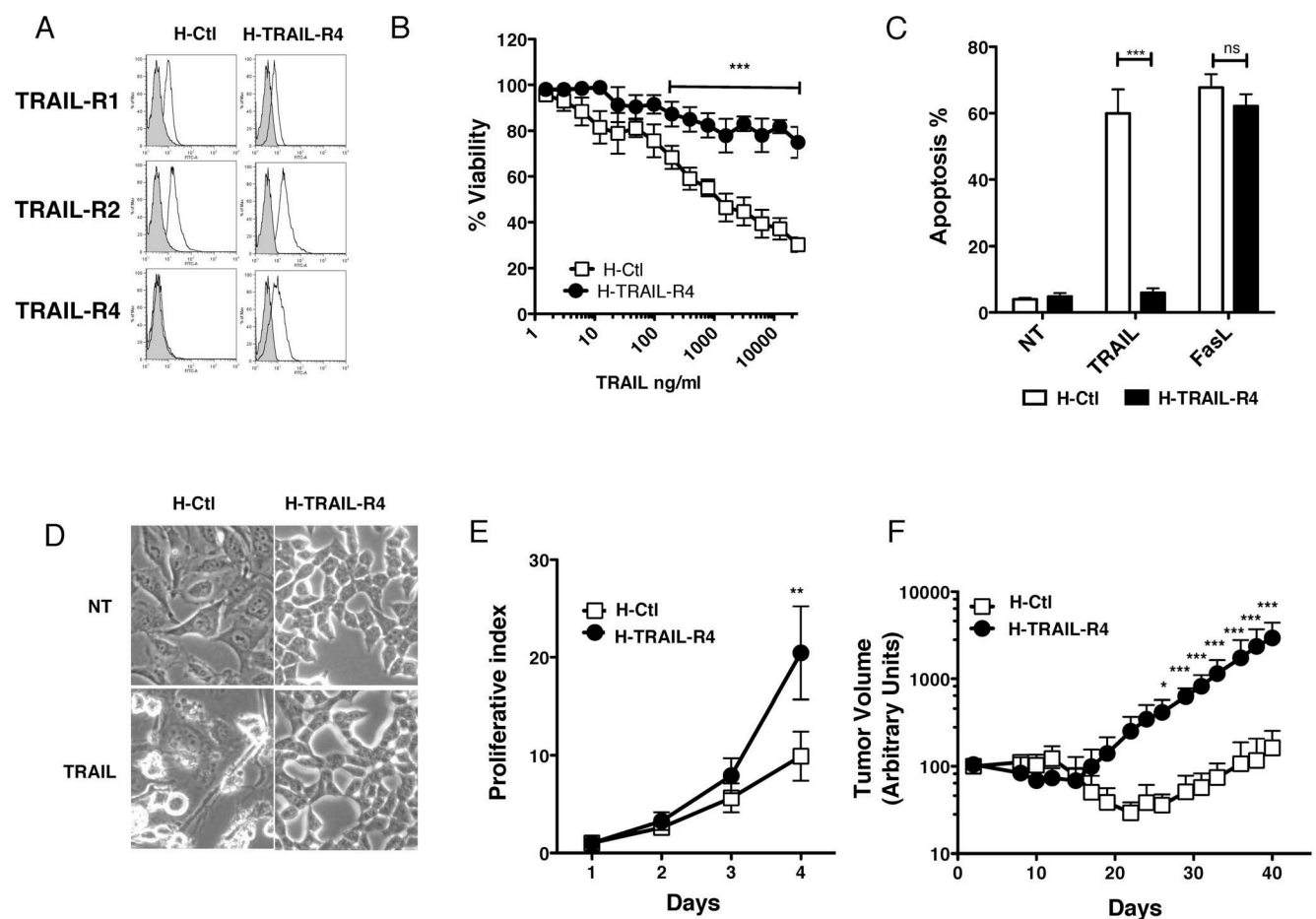


Figure 1. TRAIL-R4 protects HeLa cells from TRAIL-induced apoptosis and enhances tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*. (A) HeLa stably transduced with retroviruses encoding TRAIL-R4 (H-TRAIL-R4), or the empty mock retroviral vector (H-Ctl), were analyzed by flow cytometry for TRAIL receptor staining as indicated. (B) Cellular viability of the populations was evaluated by PMS/MTS 24 hours after treatment with increasing concentrations of recombinant His-TRAIL. HeLa control (H-Ctl in open squares) and HeLa expressing TRAIL-R4 (H-TRAIL-R4 in filled circles). Mean viability % and SD from three independent experiments are shown (mean \pm SD). *** $P < 0.001$, two-way ANOVA with Bonferroni post-tests, H-TRAIL-R4 compared with H-Ctl-Mock. (C) Apoptosis-induced by TRAIL (500 ng/ml) in H-Ctl and H-TRAIL-R4 cells 24 hours after stimulation. Apoptosis was determined by Hoechst staining. Data are representative of at least three independent experiments. *** $P < 0.001$, student t-test. (D) Representative light microscopic picture of H-Ctl versus H-TRAIL-R4 treated or not (NT) with 500 ng/ml TRAIL for 16 hours. (E) Cell proliferative index was followed for 4 days and measured using CFSE by flow cytometry. Mean analysis from three independent experiments is shown. HeLa control (H-Ctl in open squares) and HeLa expressing TRAIL-R4 (H-TRAIL-R4 in filled circles). (F) Time dependent growth of HeLa control (H-Ctl in open squares) and HeLa expressing TRAIL-R4 (H-TRAIL-R4 in filled circles) in nude mice after xenograft ($n = 10$). These results represent the mean tumor volume in arbitrary units \pm SD of a representative experiment performed with six to seven mice per group. (E) and (F) * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$, two-way ANOVA with Bonferroni post-tests, H-TRAIL-R4 compared with H-Ctl-Mock. doi:10.1371/journal.pone.0019679.g001

animal (Fig. S1B) and tumor growth was followed for 32 days (Figure 1F). Remarkably, TRAIL-R4 expressing HeLa cells exhibited a clear tumor growth advantage as compared to control cells in nude mice.

We next checked whether TRAIL-R4 ectopic expression affected cell proliferation in two other TRAIL-sensitive tumor cell lines, the Jurkat T cell lymphoma and the colon carcinoma SW480. To address this question, Jurkat and SW480 cell lines were infected with an empty vector (J-Ctl and SW-Ctl) or a retroviral vector encoding TRAIL-R4 (J-TRAIL-R4 and SW-TRAIL-R4). Expression levels of TRAIL-R4 and TRAIL-R2 were analyzed by flow cytometry (Figure 2A and B) and cell sensitivity to TRAIL-induced cell death was determined by PMS-MTS assay. Similar to HeLa cells, ectopic expression of TRAIL-R4 in Jurkat or SW480 cells inhibited TRAIL-induced cell death in a dose-dependent manner (Figure 2C and D). TRAIL-R4 expression, however, induced no particular modification of cell proliferation as compared to control cells (Figure 2E and F), and no change in cell morphology could be observed (not shown).

TRAIL-R4-mediated constitutive Akt activation in HeLa cells contributes to cell resistance to TRAIL-induced apoptosis and to increased cell proliferation

To explore the molecular basis of the deregulated death commitment and proliferation potential in HeLa cells expressing TRAIL-R4 ectopically, we next analyzed the activation status of Akt, a survival pathway that plays a central role in diverse cellular functions, including survival, growth, and proliferation [16].

Strikingly, while Akt appeared to be constitutively activated in Jurkat and SW480 cells irrespective of TRAIL-R4 ectopic expression, a differential Akt phosphorylation profile was detected in H-TRAIL-R4 cells as compared to control parental HeLa cells (Figure 3A). Constitutive activation of Akt in HeLa cells was TRAIL-independent as TRAIL stimulation only marginally induced Akt phosphorylation in H-Ctl cells (Figure 3B). Activation of Akt in these cells appeared to be restricted to TRAIL-R4. Accordingly, ectopic expression of TRAIL-R3 (Figure 3B), TRAIL-R2 (not shown) or a chimeric TRAIL receptor encoding the extracellular domain of

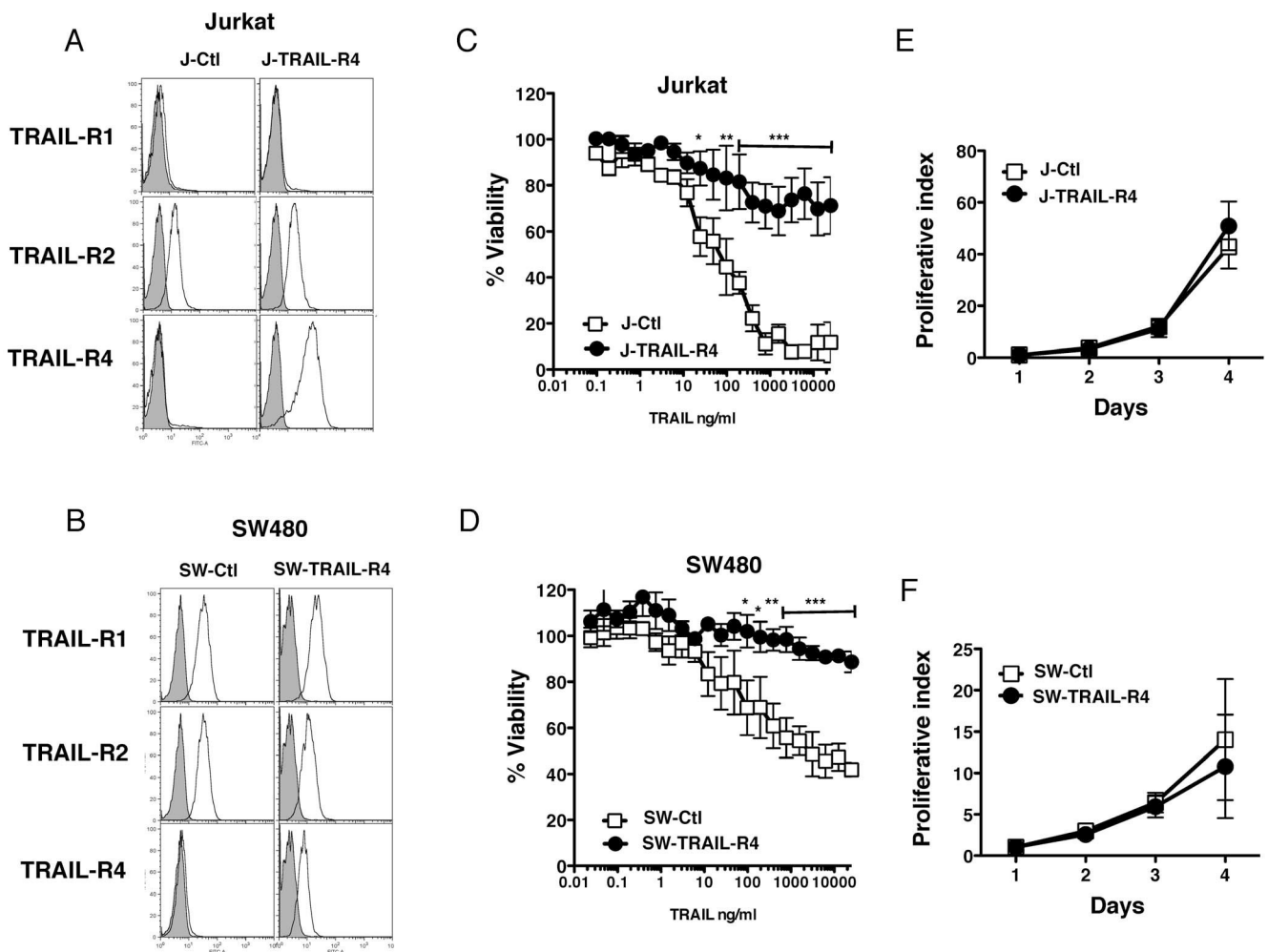


Figure 2. TRAIL-R4 ectopic expression fails to promote cell proliferation in Jurkat and SW480 cells. (A and B) Jurkat and SW480 cells were stably transduced with retroviruses encoding TRAIL-R4 (J-TRAIL-R4 and SW-TRAIL-R4), or the empty mock retroviral vector (J-Ctl and SW-Ctl), respectively. Cells were analyzed by flow cytometry for TRAIL receptor staining as indicated. (C and D) Cellular viability was evaluated by PMS/MTS 24 hours after treatment with increasing concentrations of recombinant His-TRAIL. Jurkat or SW480 control cells (J-Ctl or SW-Ctl in open squares) and Jurkat or SW480 expressing ectopically TRAIL-R4 (J-TRAIL-R4 or SW-TRAIL-R4 in filled circles). (E and F) Cell proliferative index was measured as in Figure 1. Mean proliferative index, viable cells and SD from three independent experiments are shown (mean \pm SD). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, two-way ANOVA with Bonferroni post-tests, J- or SW-TRAIL-R4 compared with J- and SW-Ctl-Mock respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0019679.g002

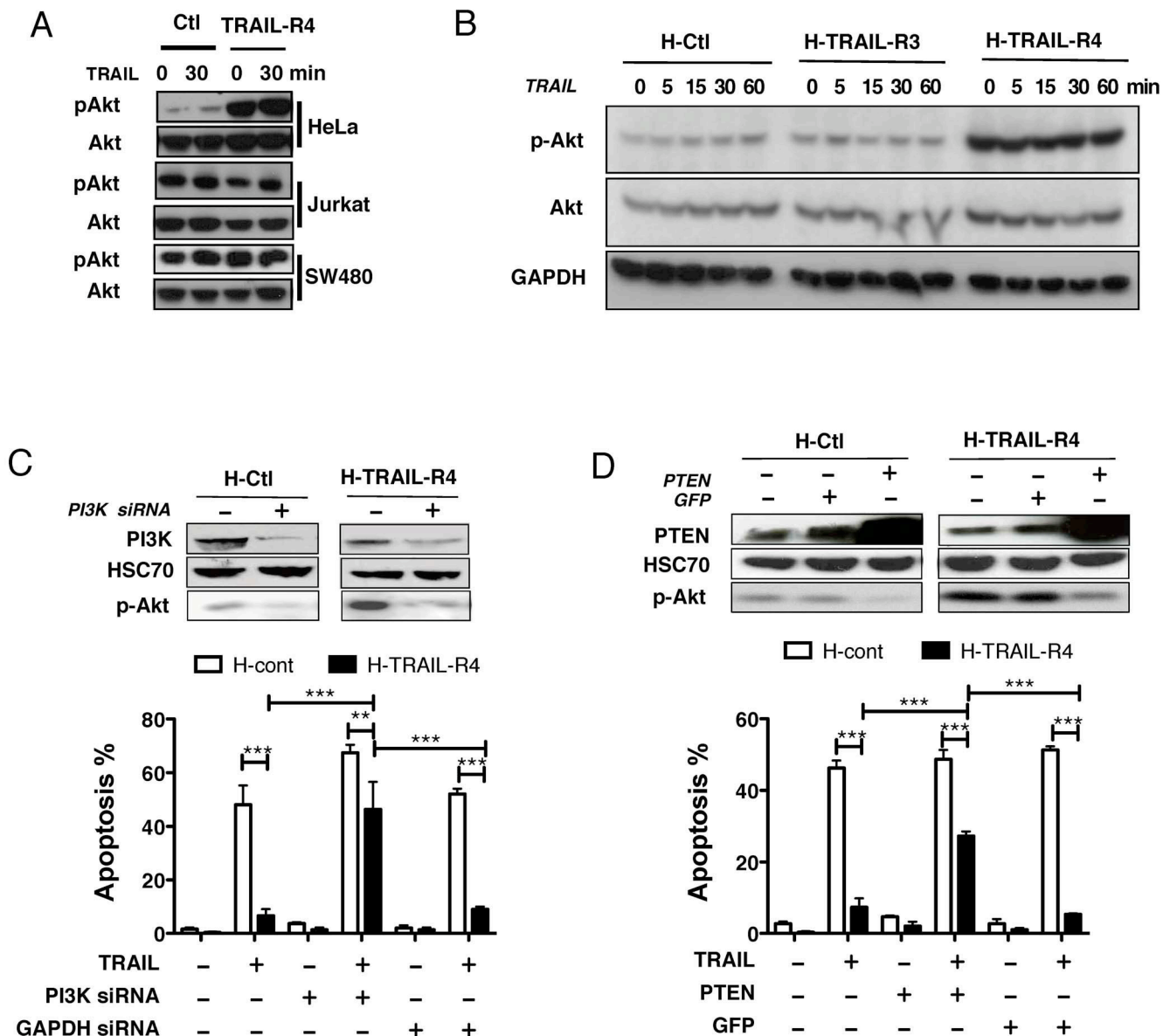


Figure 3. TRAIL-R4-mediated constitutive Akt activation contributes to cell resistance to TRAIL-induced apoptosis in HeLa cells. (A) Total Akt and phospho-Akt were monitored by western blot from HeLa, Jurkat and SW480 cells expressing TRAIL-R4 and compared to control cells (Ctl). Unstimulated or TRAIL stimulated (500 ng/ml for 30 minutes) cell samples are shown. (B) H-Ctl, H-TRAIL-R4 or HeLa cells expressing TRAIL-R3 (H-TRAIL-R3) were stimulated with TRAIL (500 ng/ml) for the indicated time and total Akt or phospho-Akt expression was assessed as above. Sample loading was assessed using GAPDH for normalization. (C) H-Ctl and H-TRAIL-R4 cells were transfected with a siRNA targeting PI3K or a scramble siRNA for 48 hours and stimulated or not with TRAIL (500 ng/ml) for 6 hours. Phosphorylation of Akt and PI3K expression levels were analyzed by western blot, and apoptosis was analyzed by Hoechst staining. (D) H-Ctl and H-TRAIL-R4 cells were transfected with a GFP mock vector or with a vector encoding PTEN for 24 hours. Expression levels of phospho-Akt and PTEN were analyzed by western blot and apoptosis induced by TRAIL was monitored as above. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. doi:10.1371/journal.pone.0019679.g003

TRAIL-R1 fused to TRAIL-R2 (Figure S2) induced no change in Akt activation, contrary to a chimeric construct encoding TRAIL-R4 intracellular domain (Figure S2). Inhibition of Akt phosphorylation either using siRNA targeting the regulatory subunit of PI3K (Figure 3C), or by over-expressing PTEN (Figure 3D) sensitized H-TRAIL-R4 cells to TRAIL-induced cell death, indicating that cell resistance to TRAIL in these cells is, at least partly, due to the sustained activation of the Akt pathway. Accordingly, the pharmacological inhibitor of Akt phosphorylation, LY294002, significantly restored TRAIL-induced apoptosis in H-TRAIL-R4 cells (Figure 4A). Notably, sensitization to TRAIL-induced cell death

was not associated with an increase in caspase-8 cleavage, but rather with an increase in caspase-3 processing (Figure 4B and C), suggesting that Akt-mediated inhibition most likely occurs downstream of the TRAIL DISC probably at the mitochondrial or post mitochondrial level. Remarkably, LY294002 reduced H-TRAIL-R4-mediated cell proliferation to levels comparable to those of control parental cells (Figure 4D).

Altogether our findings suggest that TRAIL-R4 in HeLa cells is a regulatory receptor whose anti-apoptotic functions involve both TRAIL DISC targeting and activation of the Akt survival pathway.

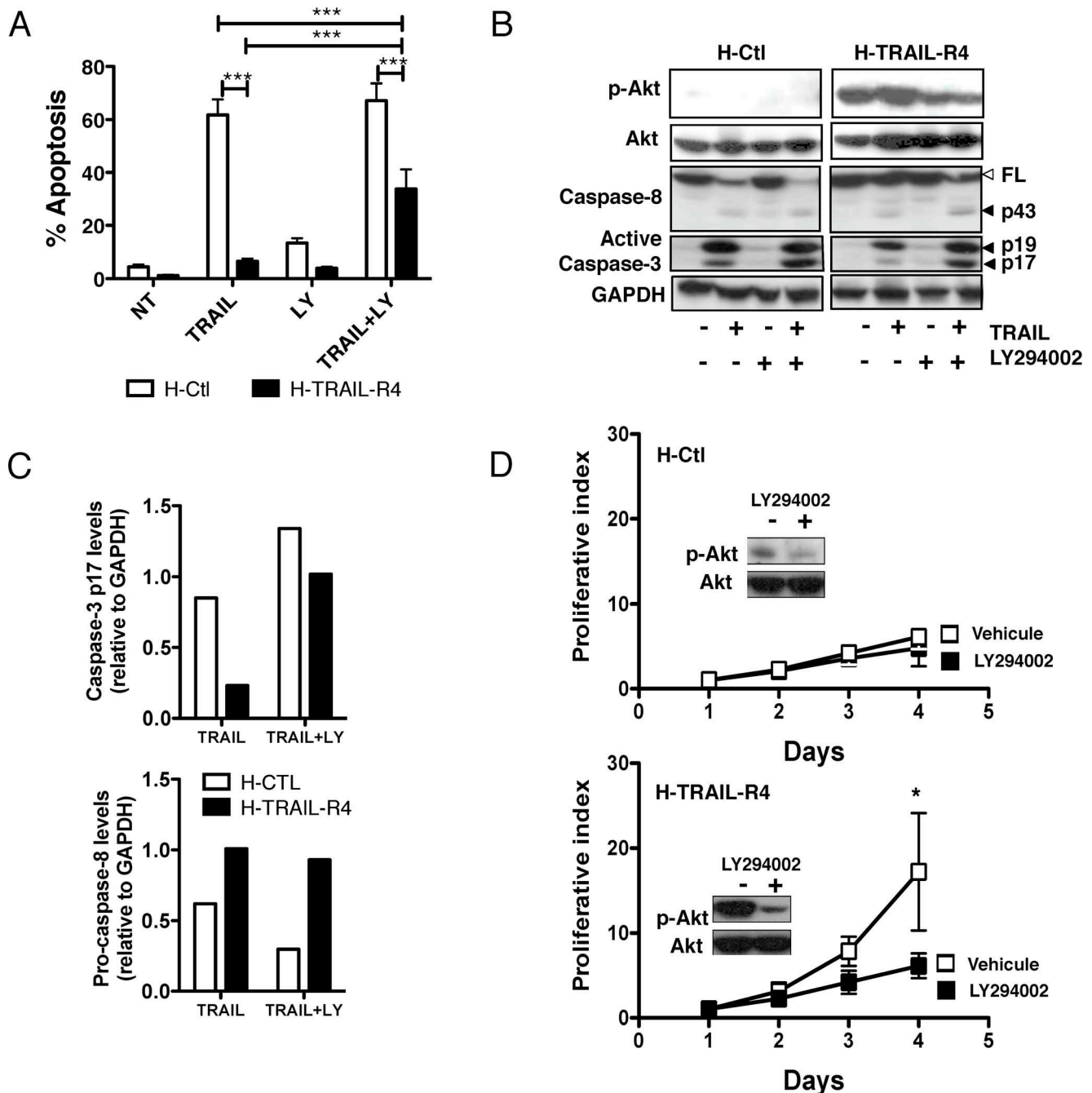


Figure 4. Inactivation of Akt restores partial sensitivity to TRAIL-induced cell death in TRAIL-R4 expressing cells and restores normal cell proliferation index. (A) HeLa H-Ctl and H-TRAIL-R4 cells were left untreated or pretreated for 1 hour with the Akt inhibitor LY294002 (100 μ M) then stimulated or not with TRAIL (500 ng/ml) for 24 hours and apoptosis was analyzed after Hoechst staining. These results are representative of at least 3 independent experiments. Mean percentage of apoptotic cells and SD are shown (mean \pm SD). *** $P < 0.001$, one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. (B) Cells were stimulated either with LY294002 (100 μ M) then treated or not with TRAIL as above and cell lysates were processed by western blot for the analysis of Akt phosphorylation, caspase-8 and active caspase-3. Filled arrows show caspase cleavage products. The empty arrow shows full length caspase-8. Densitometry analysis of caspase-3 p17 and caspase-8 full-length immunoreactive bands were obtained using ImageJ software, normalized with respect to GAPDH, and plotted in (C). (D) Cellular growth in the presence or the absence of Akt inhibitor LY294002 (10 μ M) was monitored during 4 days by flow cytometry analysis using CFSE. LY294002 was applied every day to the cell culture supernatant to afford sustained inhibition of Akt.

Discussion

TRAIL is an attractive anti-tumoral agent owing to its ability to selectively induce apoptosis in tumor cells [17,18] and thus TRAIL

derivatives or recombinant TRAIL preparations have entered clinical trials [1]. The molecular mechanisms governing TRAIL-induced cell death or signal transduction remain, however, only partially understood. Cell resistance to TRAIL-induced cell death can arise

both from the inhibition of the apoptotic machinery, or more specifically from the deregulation of the expression and/or the functionality of TRAIL receptors. Likewise, loss of TRAIL-R1 or TRAIL-R2 expression [19,20,21,22] or expression of TRAIL-R3 or TRAIL-R4, two main antagonistic receptors [9,10,11,12,13], abrogate TRAIL-induced cell death selectively, without affecting the apoptotic machinery triggered by other members of the TNF family, nor the intrinsic pathway. Likewise, overexpression of TRAIL-R4 protects tumor cells against TRAIL-induced cell death by regulating caspase-8 activation at the DISC level [10,15].

In the present study, we provide evidence that TRAIL-R4 in HeLa cells a) partially protects from TRAIL-induced apoptosis and b) enhances cell proliferation index through Akt activation in a TRAIL-independent manner. Remarkably, TRAIL-R4-mediated Akt activation in HeLa cells leads to drastic morphological changes, such as reduced cell size and loss of adhesion, suggesting that TRAIL-R4 may exhibit pro-metastatic properties (Figure 5). These findings, however, may be restricted to tumor cell lines expressing low levels of active Akt, since contrary to HeLa cells, no morphological or proliferative changes were detected in Jurkat and SW480 cells, which express high levels of active Akt. Our findings nonetheless clearly suggest, for the first time, that TRAIL-R4 exhibits unexpected signaling properties conferring cellular growth advantage both *in vitro* and *in vivo*.

Tentative model for Akt activation from TRAIL-R4 in HeLa cells

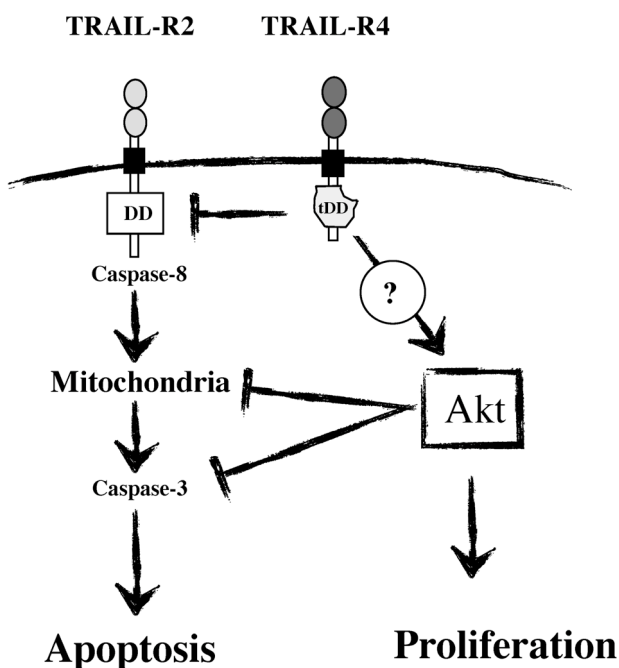


Figure 5. Model for Akt activation from TRAIL-R4 in HeLa cells. TRAIL-R4 is known to inhibit caspase-8 activation induced by TRAIL-R2 upon TRAIL stimulation. We propose here that TRAIL-R4 may, in addition, trigger Akt activation in a ligand independent manner. Constitutive activation of Akt in HeLa cells would therefore inhibit caspase-3 activation at the mitochondrial or post-mitochondrial level to inhibit apoptosis induced by TRAIL, and could possibly foster cell proliferation.

doi:10.1371/journal.pone.0019679.g005

Besides apoptosis triggering, and depending on the cell line or type, TRAIL stimulation can induce non apoptotic signaling pathways including Akt [23,24,25,26], NF- κ B [27] or MAPK [28,29], cell proliferation [26,30,31] or differentiation [32,33,34]. It has recently been proposed that the activation of non apoptotic signaling pathways by TRAIL involve the formation of a cytosolic secondary complex which, contrary to TNF [35], allows the recruitment of adaptor proteins and kinases including TRAF2, RIP or NEMO [36]. Activation of Akt by TRAIL-R4 in HeLa cells by such a secondary complex is unlikely, as this pathway appears to be activated in a TRAIL-ligand independent manner. Moreover, we have not yet been able to identify this secondary complex (not shown).

How TRAIL-R4 mediates Akt activation in HeLa cells remains unknown for the moment. TRAIL-R4 shares relatively high homology with TRAIL-R1 and TRAIL-R2 [7] and is the only TRAIL antagonistic receptor that harbors an intracellular domain. Interestingly, ectopic expression of the TRAIL-R4 intracellular domain in HeLa cells induces constitutive AKT activation. This domain would therefore provide an ideal docking site for a putative binding partner. It is therefore tempting to speculate that the intracellular domain of TRAIL-R4 may interact with membrane associated or cytosolic proteins already known to bind to TRAIL-R1 or TRAIL-R2 such as GSK3 [37], ARAP1 [38], DAP3 [39], Burton's tyrosine kinase [40], or PRMT5 [41]. The exact molecular mechanism involved in this regulation therefore needs to be further investigated.

Altogether, our findings indicate for the first time that, besides inhibiting TRAIL-induced cell death, TRAIL-R4 is able to regulate the PI3K/Akt signaling pathway in cell type-dependent manner leading to cell resistance to apoptosis and to enhanced cellular growth.

Materials and Methods

Reagents and antibodies

His-tagged recombinant soluble human TRAIL and Fc-TRAIL-R2 were produced and used as described previously [42]. For Western blotting experiments, anti-GAPDH, anti-PI3K, anti-HSC70 were obtained from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA), anti-phospho-Akt from Upstate (Milipore, Molsheim, France), anti-Akt, and anti-PTEN from Cell Signaling (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). Antibodies used for flow cytometry, anti-TRAIL-R1 (wB-K32), anti-TRAIL-R2 (B-L27), anti-TRAIL-R3 (wB-B44), anti-TRAIL-R4 (wB-P30), and anti-TRAIL were from Diaclone (Besançon, France). The PI3K/Akt inhibitor LY294002 was purchased from Cell Signaling (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France).

Cell culture and transfection

HeLa (human cervix carcinoma), SW480 (Colon carcinoma) and Jurkat cells (T Lymphoma) were obtained from the ATCC. HeLa and SW480 cells were cultured in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, Lyon, France) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco-BRL, Erigny, France), and Jurkat cells were cultured in RPMI as above. Transfection of HeLa cells was carried out using JetsetiENDOTM reagent (Eurogentec, Angers, France), according to the manufacturer's instructions using the following PI3K siRNA (5'-GGGUGUGGAUACACCAU-3') and siRNA control (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). PTEN transfections were performed with the pSG5L-HA-PTEN construct (kindly provided by Dr William Sellers, Dana-Farber Cancer Institute, Boston) using TransPEITM (Eurogentec).

Retroviral production and cell transduction

The retroviral vector pMSCVpuro and the generation of viruses have previously been described [30]. TRAIL-R4 full-length construct

was subcloned from a pCR-3 vector (Invitrogen) to the retroviral vector pMSCV-puro as a HindIII-XhoI fragment. HeLa cells were transduced for 16 hours with viral supernatants containing polybrene (8 µg/ml), washed in phosphate buffered saline (PBS), and selected in complete medium containing puromycin (2.5 µg/ml).

Measurement of cell viability and apoptosis

Cell viability assays were performed in 96-well plates. 10^4 cells per well were incubated at 37°C for 24 hours with increasing concentrations of His-TRAIL (from 0 to 10,000 ng/ml). Cell viability was determined by the PMS/MTS method, according to the manufacturer's specifications (Promega, Madison, WI, USA.). Apoptosis was assessed by Hoechst staining by determining the percentage of condensed nuclei from at least 300 cells per condition. For Akt inhibition, cells were pretreated with LY294002 (100 µM) one hour before TRAIL treatment (500 ng/ml, 5 hours). PI3K inhibition and PTEN expression were measured 48 and 24 hours after transfection respectively and cells were simultaneously treated 5 hours with 500 ng/ml of His-TRAIL.

Cell proliferation

To measure cell proliferation the different cellular populations were plated at the same density and counted each day. CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Molecular Probes, Invitrogen) was used to measure cell proliferation using a LSRII flow cytometer (DB Biosciences) and the ModFIT Software (Verity Software House Topsham, ME) was applied to determine the proliferation index.

Western blotting

Lysates were resolved by sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites were blocked in PBS containing 0.05% Tween 20 and 5% powdered milk. Immunoblots were then incubated with specific primary antibody, followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, and developed by the enhanced chemiluminescence method according to the manufacturer's protocol (Pierce, Rockford, IL).

In vivo studies

Six weeks old female athymic nude mice (Harlan, Le Moulon, Gannat) were subcutaneously xenografted with 1×10^6 H-Ctl in the right flank and 1×10^6 H-TRAIL-R4 in the left flank ($n = 10$). Tumor volume was obtained after caliper measurement of the tumor and the formula $(l \times l \times L)/2$ with l the smaller and L the higher dimension.

Supporting Information

Figure S1 (A) The proliferative index of H-Ctl and H-TRAIL-R4 cells was measured in the presence or in the absence of 10 µg recombinant Fc-TRAIL-R2, as described in the manuscript Figure 1E. Fc-TRAIL-R2 was added to the culture daily for 4 days. (B) Representative picture of nude mice xenografted with HeLa control (H-Ctl on the left flank) and HeLa expressing TRAIL-R4 (H-TRAIL-R4 on the right flank) and the corresponding tumors harvested from mice pictured. (TIFF)

Figure S2 (A) Schematic representation of TRAIL receptor chimeric constructs (OM043, OM050 and OM051). Vectors

were constructed using standard cloning procedures. TRAIL-R2 and TRAIL-R4 intracellular domains (icd) were obtained by polymerase chain reaction from pCRIII vectors encoding full length TRAIL-R2 and TRAIL-R4 as described earlier [10], with the following primer pairs: TRAIL-R2 forward primer (5'- GTC GAC TGT TCT CTC TCA GGC ATC-3'); reverse primer (5'- CTC GAG CGG CCG CCA GTG TGA TGG-3') and TRAIL-R4 forward primer (5'- GTC GAC TAT CAC TAC CTT ATC ATC-3'); reverse primer (5'- CTC GAG TCA CAG GCA GGA CGT AGC-3') containing a SalI and a XhoI site. Oligonucleotide primers and Pfu polymerase were purchased from Eurogentech (Angers, France) and Sigma-Aldrich (Lyon, France) respectively. The resulting amplified fragments were subcloned into pCR-Blunt (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and checked by sequencing. TRAIL-R2-icd and TRAIL-R4-icd were subcloned between the SalI and XhoI sites of pCRIII vectors encoding the extracellular domains (ecd) of TRAIL-R1 (aa 1–239, PS688), TRAIL-R2 (aa 1–212, PS664) or TRAIL-R4 (aa 1–211, PS690), kindly provided by Dr Pascal Schneider (Lausanne, Switzerland). Resulting TRAIL-R1ecd-TRAIL-R2icd, TRAIL-R4ecd-TRAIL-R2icd and TRAIL-R2ecd-TRAIL-R4icd DNA fragments were subcloned into a pMSCV-Puro retroviral vector between HindIII and XhoI, generating pMSCV-Puro-TRAIL-R1ecd-TRAIL-R2icd (OM043), pMSCV-Puro-TRAIL-R4ecd-TRAIL-R2icd (OM051) and pMSCV-Puro-TRAIL-R2ecd-TRAIL-R4icd (OM050). (B) Receptor expression in HeLa cells was analyzed by flow cytometry after infection of TRAIL receptor fusion constructs (OM043, OM050 and OM051) or the corresponding empty vector (OM181). (C) Biochemical analysis of TRAIL chimeric receptors. Immunoprecipitations were performed using a control antibody (lanes 1, 4, 7, 10, 13 and 16) or antibodies targeting TRAIL-R1 (lanes 2, 3, 5 and 6), TRAIL-R2 (lanes 8, 9, 11 and 12) and TRAIL-R4 (lanes 14, 15, 17 and 18) from DIAclone (Besançon, France). Antibodies were applied either after lysis (1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16 and 18), or on intact cells (2, 5, 8, 11, 14 and 17) for 1 h on ice. The latter samples were subsequently subjected to lysis in NP40 lysis buffer and samples were precleared on sepharose 6B beads before immunoprecipitation using agarose protein G beads. Samples were then washed extensively and subjected to western blot using anti-TRAIL-R1, -R2 and -R4 antibodies from Milipore (Molsheim, France). Note that TRAIL-R4's extracellular domain is not recognized by the anti-TRAIL-R4 antibody from Chemicon. *ns stands for non specific. (D) AKT activation was analyzed by western blot as described in the text. (TIFF)

Acknowledgments

We would like to thank Diaclone for invaluable TRAIL-R antibodies, Dr. Pascal Schneider (Department of Biochemistry, Epalinges, Switzerland) and Dr. William Sellers (Dana-Farber Cancer Institute, Boston) for providing reagents.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OM NL Aymeric Morlé DM. Performed the experiments: NL Alexandre Morizot DM GJ EI Aymeric Morlé SS BR. Analyzed the data: OM NL Alexandre Morizot DM GJ EI Aymeric Morlé SS BR. Wrote the paper: OM NL DM SS ES CG.

References

- Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG (2008) Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *J Clin Oncol* 26: 3621–3630.

2. Feinstein E, Kimchi A, Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E (1995) The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem Sci* 20: 342–344.
3. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, et al. (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 276: 46639–46646.
4. Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, et al. (2000) TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* 2: 241–243.
5. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, et al. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14: 5579–5588.
6. Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Solary E, Micheau O (2007) TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. *Expert Opin Ther Targets* 11: 1299–1314.
7. Meng RD, McDonald ER, 3rd, Sheikh MS, Fornace AJ, Jr., El-Deiry WS (2000) The TRAIL decoy receptor TRUND (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis. *Mol Ther* 1: 130–144.
8. Bouralexis S, Findlay DM, Atkins GJ, Labrinidis A, Hay S, et al. (2003) Progressive resistance of BTK-143 osteosarcoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis is mediated by acquisition of DcR2/TRAIL-R4 expression: resensitisation with chemotherapy. *Br J Cancer* 89: 206–214.
9. Davidovich IA, Levenson AS, Levenson Chernokhvostov VV (2004) Overexpression of DcR1 and survivin in genetically modified cells with pleiotropic drug resistance. *Cancer Lett* 211: 189–197.
10. Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E, et al. (2006) Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 26: 7046–7055.
11. Toscano F, Fajoui ZE, Gay F, Lalaoui N, Parmentier B, et al. (2008) P53-mediated upregulation of DcR1 impairs oxaliplatin/TRAIL-induced synergistic anti-tumour potential in colon cancer cells. *Oncogene* 27: 4161–4171.
12. Clancy L, Mruk K, Archer K, Woelfel M, Mongkolsapaya J, et al. (2005) Pre-ligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18099–18104.
13. Riccioni R, Pasquini L, Mariani G, Saulle E, Rossini A, et al. (2005) TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. *Haematologica* 90: 612–624.
14. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, et al. (1997) Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277: 818–821.
15. Morizot A, Merino D, Lalaoui N, Jacquemin G, Granci V, et al. (2011) Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level. *Cell Death Differ* 18: 700–711.
16. Mirza AM, Kohn AD, Roth RA, McMahon M (2000) Oncogenic transformation of cells by a conditionally active form of the protein kinase Akt/PKB. *Cell Growth Differ* 11: 279–292.
17. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, et al. (1999) Tumorcidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5: 157–163.
18. Finnberg N, El-Deiry WS (2006) Selective TRAIL-induced apoptosis in dysplastic neoplasia of the colon may lead to new neoadjuvant or adjuvant therapies. *Clin Cancer Res* 12: 4132–4136.
19. Elias A, Siegelin MD, Steinmuller A, von Deimling A, Lass U, et al. (2009) Epigenetic silencing of death receptor 4 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in gliomas. *Clin Cancer Res* 15: 5457–5465.
20. Zhang Y, Zhang B (2008) TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5. *Mol Cancer Res* 6: 1861–1871.
21. Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, et al. (2005) Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 106: 3214–3222.
22. Lee SH, Shin MS, Kim HS, Lee HK, Park WS, et al. (2001) Somatic mutations of TRAIL-receptor 1 and TRAIL-receptor 2 genes in non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 20: 399–403.
23. Zauli G, Sancio S, Cataldi A, Sabatini N, Bosco D, et al. (2005) PI-3K/Akt and NF-kappaB/IkappaBalpha pathways are activated in Jurkat T cells in response to TRAIL treatment. *J Cell Physiol* 202: 900–911.
24. Secchiero P, Gonelli A, Carnevale E, Milani D, Pandolfi A, et al. (2003) TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. *Circulation* 107: 2250–2256.
25. Morel J, Audo R, Hahne M, Combe B (2005) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation through mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Biol Chem* 280: 15709–15718.
26. Audo R, Combe B, Coulet B, Morel J, Hahne M (2009) The pleiotropic effect of TRAIL on tumor-like synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients is mediated by caspases. *Cell Death Differ* 16: 1227–1237.
27. Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, et al. (1997) TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* 7: 831–836.
28. Secchiero P, Melloni E, Heikinheimo M, Mannisto S, Di Pietro R, et al. (2004) TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway. *Blood* 103: 517–522.
29. Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H (2007) TRAIL signalling: Decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1462–1475.
30. Kavurma MM, Schoppet M, Bobryshev YV, Khachigian LM, Bennett MR (2008) TRAIL stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of NF-kappaB and induction of insulin-like growth factor-1 receptor. *J Biol Chem* 283: 7754–7762.
31. Vilimanovich U, Bumbasirevic V (2008) TRAIL induces proliferation of human glioma cells by c-FLIPL-mediated activation of ERK1/2. *Cell Mol Life Sci* 65: 814–826.
32. Freer-Prokop M, O'Flaherty J, Ross JA, Weyman CM (2009) Non-canonical role for the TRAIL receptor DR5/FADD/caspase pathway in the regulation of MyoD expression and skeletal myoblast differentiation. *Differentiation* 78: 205–212.
33. Rimondi E, Secchiero P, Quaroni A, Zerbinati C, Capitani S, et al. (2006) Involvement of TRAIL/TRAIL-receptors in human intestinal cell differentiation. *J Cell Physiol* 206: 647–654.
34. Yen ML, Tsai HF, Wu YY, Hwa HL, Lee BH, et al. (2008) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces osteoclast differentiation from monocyte/macrophage lineage precursor cells. *Mol Immunol* 45: 2205–2213.
35. Micheau O, Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114: 181–190.
36. Varfolomeev E, Maecker H, Sharp D, Lawrence D, Renz M, et al. (2005) Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 280: 40599–40608.
37. Sun M, Song L, Li Y, Zhou T, Jope RS (2008) Identification of an antiapoptotic protein complex at death receptors. *Cell Death Differ* 15: 1887–1900.
38. Simova S, Klima M, Cernak L, Sourkova V, Andera L (2008) Arf and Rho GAP adapter protein ARAP1 participates in the mobilization of TRAIL-R1/DR4 to the plasma membrane. *Apoptosis* 13: 423–436.
39. Miyazaki T, Reed JC (2001) A GTP-binding adapter protein couples TRAIL receptors to apoptosis-inducing proteins. *Nat Immunol* 2: 493–500.
40. Schmidt U, van den Akker E, Parren-van Amelsvoort M, Litos G, de Bruijn M, et al. (2004) Btk is required for an efficient response to erythropoietin and for SCF-controlled protection against TRAIL in erythroid progenitors. *J Exp Med* 199: 785–795.
41. Tanaka H, Hoshikawa Y, Oh-hara T, Koike S, Naito M, et al. (2009) PRMT5, a novel TRAIL receptor-binding protein, inhibits TRAIL-induced apoptosis via nuclear factor-kappaB activation. *Mol Cancer Res* 7: 557–569.
42. Schneider DB, Vassalli G, Wen S, Driscoll RM, Sassani AB, et al. (2000) Expression of Fas ligand in arteries of hypercholesterolemic rabbits accelerates atherosclerotic lesion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 298–308.

Références

- Abhari, B. A., S. Cristofanon, et al. (2012). "RIP1 is required for IAP inhibitor-mediated sensitization for TRAIL-induced apoptosis via a RIP1/FADD/caspase-8 cell death complex." *Oncogene*.
- Adams, J. (2003). "The proteasome: structure, function, and role in the cell." *Cancer Treat Rev* 29 Suppl 1: 3-9.
- Adams, J., M. Behnke, et al. (1998). "Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids." *Bioorg Med Chem Lett* 8(4): 333-8.
- Alcala, M. A., Jr., K. Park, et al. (2010). "Effect of hyperthermia in combination with TRAIL on the JNK-Bim signal transduction pathway and growth of xenograft tumors." *J Cell Biochem* 110(5): 1073-81.
- Andrews, J. M. and C. J. Roberts (2007). "A Lumry-Eyring nucleated polymerization model of protein aggregation kinetics: 1. Aggregation with pre-equilibrated unfolding." *J Phys Chem B* 111(27): 7897-913.
- Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." *Science* 181(4096): 223-30.
- Arai, T., Y. Akiyama, et al. (1998). "Genomic organization and mutation analyses of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in colorectal carcinomas." *Cancer Lett* 133(2): 197-204.
- Arrigo, A. P. (2013). "Human small heat shock proteins: protein interactomes of homo- and hetero-oligomeric complexes: an update." *FEBS Lett* 587(13): 1959-69.
- Arrigo, A. P., J. P. Suhan, et al. (1988a). "Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein." *Mol Cell Biol* 8(12): 5059-71.
- Arrigo, A. P., K. Tanaka, et al. (1988b). "Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome)." *Nature* 331(6152): 192-4.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* 281(5381): 1305-8.
- Ashkenazi, A., R. C. Pai, et al. (1999). "Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand." *J Clin Invest* 104(2): 155-62.
- Aziji, K., S. Yuvaraj, et al. (2012). "Kinome profiling of non-canonical TRAIL signaling reveals RIP1-Src-STAT3-dependent invasion in resistant non-small cell lung cancer cells." *J Cell Sci* 125(Pt 19): 4651-61.
- Aziji, K., S. Yuvaraj, et al. (2013). "MAPK p38 and JNK have opposing activities on TRAIL-induced apoptosis activation in NSCLC H460 cells that involves RIP1 and caspase-8 and is mediated by Mcl-1." *Apoptosis* 18(7): 851-60.
- Baler, R., W. J. Welch, et al. (1992). "Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor." *J Cell Biol* 117(6): 1151-9.
- Bang, O. S., B. G. Ha, et al. (2000). "Activation of Akt is induced by heat shock and involved in suppression of heat-shock-induced apoptosis of NIH3T3 cells." *Biochem Biophys Res Commun* 278(2): 306-11.
- Banobre-Lopez, M., A. Teijeiro, et al. (2013). "Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment." *Rep Pract Oncol Radiother* 18(6): 397-400.
- Baritaki, S., S. Apostolakis, et al. (2007). "Reversal of tumor resistance to apoptotic stimuli by alteration of membrane fluidity: therapeutic implications." *Adv Cancer Res* 98: 149-90.
- Barnes, J. A., D. J. Dix, et al. (2001). "Expression of inducible Hsp70 enhances the proliferation of MCF-7 breast cancer cells and protects against the cytotoxic effects of hyperthermia." *Cell Stress Chaperones* 6(4): 316-25.
- Barrott, J. J. and T. A. Haystead (2013). "Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer." *FEBS J* 280(6): 1381-96.
- Baur, A., A. Stabler, et al. (2003). "MR-imaging changes of musculoskeletal soft-tissue sarcomas associated with neoadjuvant chemotherapy and hyperthermia." *Int J Hyperthermia* 19(4): 391-401.
- Beere, H. M., B. B. Wolf, et al. (2000). "Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome." *Nat Cell Biol* 2(8): 469-75.
- Bellot, G. L., D. Liu, et al. (2013). "ROS, autophagy, mitochondria and cancer: Ras, the hidden master?" *Mitochondrion* 13(3): 155-62.
- Benesch, J. L., M. Ayoub, et al. (2008). "Small heat shock protein activity is regulated by variable oligomeric substructure." *J Biol Chem* 283(42): 28513-7.
- Berglund, H., D. Olerenshaw, et al. (2000). "The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human FADD death domain." *J Mol Biol* 302(1): 171-88.
- Bertrand, M. J., S. Milutinovic, et al. (2008). "cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination." *Mol Cell* 30(6): 689-700.

- Bhak, G., Y. J. Choe, et al. (2009). "Mechanism of amyloidogenesis: nucleation-dependent fibrillation versus double-concerted fibrillation." *BMB Rep* 42(9): 541-51.
- Billen, L. P., C. L. Kokoski, et al. (2008b). "Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax." *PLoS Biol* 6(6): e147.
- Billen, L. P., A. Shamas-Din, et al. (2008a). "Bid: a Bax-like BH3 protein." *Oncogene* 27 Suppl 1: S93-104.
- Bironaite, D., A. Pivorunas, et al. (2012). "Upregulation of iHsp70 by mild heat shock protects rabbit myogenic stem cells: involvement of JNK signalling and c-Jun." *Cell Biol Int* 36(12): 1089-96.
- Boatright, K. M., M. Renatus, et al. (2003). "A unified model for apical caspase activation." *Mol Cell* 11(2): 529-41.
- Boch, J., H. Scholze, et al. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." *Science* 326(5959): 1509-12.
- Bodmer, J. L., N. Holler, et al. (2000b). "TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8." *Nat Cell Biol* 2(4): 241-3.
- Bodmer, J. L., P. Meier, et al. (2000a). "Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL." *J Biol Chem* 275(27): 20632-7.
- Boelens, W. C. (2014). "Cell biological roles of alphaB-crystallin." *Prog Biophys Mol Biol* 115(1): 3-10.
- Boffetta, P., M. Hashibe, et al. (2006). "The burden of cancer attributable to alcohol drinking." *Int J Cancer* 119(4): 884-7.
- Bolhuis, S. and C. Richter-Landsberg (2010). "Effect of proteasome inhibition by MG-132 on HSP27 oligomerization, phosphorylation, and aggresome formation in the OLN-93 oligodendroglia cell line." *J Neurochem* 114(4): 960-71.
- Bond, U. and M. J. Schlesinger (1985). "Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts." *Mol Cell Biol* 5(5): 949-56.
- Boulares, A. H., A. G. Yakovlev, et al. (1999). "Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells." *J Biol Chem* 274(33): 22932-40.
- Bournias-Vardiabasis, N. and C. H. Buzin (1986). "Developmental effects of chemicals and the heat shock response in Drosophila cells." *Teratog Carcinog Mutagen* 6(6): 523-36.
- Bratton, S. B., G. Walker, et al. (2001). "Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes." *EMBO J* 20(5): 998-1009.
- Bray, F., A. Jemal, et al. (2012). "Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study." *Lancet Oncol* 13(8): 790-801.
- Brockwell, D. J. and S. E. Radford (2007). "Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes?" *Curr Opin Struct Biol* 17(1): 30-7.
- Bruey, J. M., C. Ducasse, et al. (2000b). "Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c." *Nat Cell Biol* 2(9): 645-52.
- Bruey, J. M., C. Paul, et al. (2000a). "Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo." *Oncogene* 19(42): 4855-63.
- Brunet Simioni, M., A. De Thonel, et al. (2009). "Heat shock protein 27 is involved in SUMO-2/3 modification of heat shock factor 1 and thereby modulates the transcription factor activity." *Oncogene* 28(37): 3332-44.
- Bryantsev, A. L., S. Y. Kurchashova, et al. (2007). "Regulation of stress-induced intracellular sorting and chaperone function of Hsp27 (HspB1) in mammalian cells." *Biochem J* 407(3): 407-17.
- Bucciantini, M., E. Giannoni, et al. (2002). "Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases." *Nature* 416(6880): 507-11.
- Budihardjo, I., H. Oliver, et al. (1999). "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis." *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 269-90.
- Burel, C., V. Mezger, et al. (1992). "Mammalian heat shock protein families. Expression and functions." *Experientia* 48(7): 629-34.
- Byrn, S. R., P. A. Tishmack, et al. (2011). "Analysis of two commercially available bortezomib products: differences in assay of active agent and impurity profile." *AAPS PharmSciTech* 12(2): 461-7.
- Cagnol, S. and J. C. Chambard (2010). "ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence." *FEBS J* 277(1): 2-21.
- Cairns, J., S. Qin, et al. (1994). "Dephosphorylation of the small heat shock protein Hsp27 in vivo by protein phosphatase 2A." *J Biol Chem* 269(12): 9176-83.
- Cantor, J. R. and D. M. Sabatini (2012). "Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces." *Cancer Discov* 2(10): 881-98.
- Cardozo, C., A. M. Eleuteri, et al. (1995). "Differences in catalytic activities and subunit pattern of multicatalytic proteinase complexes (proteasomes) isolated from bovine pituitary, lung, and liver.

- Changes in LMP7 and the component necessary for expression of the chymotrypsin-like activity." *J Biol Chem* 270(38): 22645-51.
- Carswell, E. A., L. J. Old, et al. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(9): 3666-70.
- Centenera, M. M., A. K. Fitzpatrick, et al. (2013). "Hsp90: still a viable target in prostate cancer." *Biochim Biophys Acta* 1835(2): 211-8.
- Chai, J., E. Shiozaki, et al. (2001b). "Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP." *Cell* 104(5): 769-80.
- Chai, J., Q. Wu, et al. (2001a). "Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding." *Cell* 107(3): 399-407.
- Chang, D. W., Z. Xing, et al. (2003). "Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation." *EMBO J* 22(16): 4132-42.
- Chang, L., H. Kamata, et al. (2006). "The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover." *Cell* 124(3): 601-13.
- Chaudhary, P. M., M. Eby, et al. (1997). "Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway." *Immunity* 7(6): 821-30.
- Che, J., M. Doubrovin, et al. (2007). "HSP70-inducible hNIS-IRES-eGFP reporter imaging: response to heat shock." *Mol Imaging* 6(6): 404-16.
- Chen, C. J., W. L. Hsu, et al. (2014). "Epidemiology of virus infection and human cancer." *Recent Results Cancer Res* 193: 11-32.
- Chen, F., R. Rezavi, et al. (2007). "Proteasome inhibition potentiates the cytotoxic effects of hyperthermia in HT-29 colon cancer cells through inhibition of heat shock protein 27." *Oncology* 73(1-2): 98-103.
- Chen, S., W. Cao, et al. (2011a). "Celecoxib promotes c-FLIP degradation through Akt-independent inhibition of GSK3." *Cancer Res* 71(19): 6270-81.
- Chen, S., L. Fu, et al. (2010). "Dissecting the roles of DR4, DR5 and c-FLIP in the regulation of geranylgeranyltransferase I inhibition-mediated augmentation of TRAIL-induced apoptosis." *Mol Cancer* 9: 23.
- Chen, W., Q. Wang, et al. (2011b). "RIP1 maintains DNA integrity and cell proliferation by regulating PGC-1 α -mediated mitochondrial oxidative phosphorylation and glycolysis." *Cell Death Differ* 21(7): 1061-70.
- Chen, W. W., H. Yu, et al. (2012). "RIP1 mediates the protection of geldanamycin on neuronal injury induced by oxygen-glucose deprivation combined with zVAD in primary cortical neurons." *J Neurochem* 120(1): 70-7.
- Cheung, A. Y. and A. Neyzari (1984). "Deep local hyperthermia for cancer therapy: external electromagnetic and ultrasound techniques." *Cancer Res* 44(10 Suppl): 4736s-4744s.
- Chinnaiyan, A. M., U. Prasad, et al. (2000). "Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4): 1754-9.
- Choi, Y. E., M. Butterworth, et al. (2009). "The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing." *J Biol Chem* 284(19): 12772-82.
- Chovatiya, R. and R. Medzhitov (2014). "Stress, inflammation, and defense of homeostasis." *Mol Cell* 54(2): 281-8.
- Cirillo, N., M. Lanza, et al. (2008). "The most widespread desmosomal cadherin, desmoglein 2, is a novel target of caspase 3-mediated apoptotic machinery." *J Cell Biochem* 103(2): 598-606.
- Clancy, L., K. Mruk, et al. (2005). "Pre-ligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(50): 18099-104.
- Clements, R. T., J. Feng, et al. (2011). "p38 MAPK-dependent small HSP27 and α B-crystallin phosphorylation in regulation of myocardial function following cardioplegic arrest." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300(5): H1669-77.
- Colotta, F., P. Allavena, et al. (2009). "Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability." *Carcinogenesis* 30(7): 1073-81.
- Cordier, F. and S. Grzesiek (2002). "Temperature-dependence of protein hydrogen bond properties as studied by high-resolution NMR." *J Mol Biol* 317(5): 739-52.
- Coss, R. A., A. W. Sedar, et al. (2002). "Hsp27 protects the cytoskeleton and nucleus from the effects of 42 degrees C at pH 6.7 in CHO cells adapted to growth at pH 6.7." *Int J Hyperthermia* 18(3): 216-32.
- Coux, O., K. Tanaka, et al. (1996). "Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes." *Annu Rev Biochem* 65: 801-47.
- Cretney, E., K. Takeda, et al. (2002). "Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice." *J Immunol* 168(3): 1356-61.

- Csermely, P., T. Schnaider, et al. (1998). "The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review." *Pharmacol Ther* 79(2): 129-68.
- Csoboz, B., G. E. Balogh, et al. (2013). "Membrane fluidity matters: hyperthermia from the aspects of lipids and membranes." *Int J Hyperthermia* 29(5): 491-9.
- Cursi, S., A. Rufini, et al. (2006). "Src kinase phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression." *EMBO J* 25(9): 1895-905.
- Dales, J. P., F. Palmerini, et al. (2001). "Caspases: conductors of the cell death machinery in lymphoma cells." *Leuk Lymphoma* 41(3-4): 247-53.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* 116(2): 205-19.
- Daugaard, M., M. Rohde, et al. (2007). "The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions." *FEBS Lett* 581(19): 3702-10.
- Degli-Esposti, M. A., P. J. Smolak, et al. (1997). "Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family." *J Exp Med* 186(7): 1165-70.
- Degterev, A., M. Boyce, et al. (2003). "A decade of caspases." *Oncogene* 22(53): 8543-67.
- Delmas, D., C. Rebe, et al. (2004). "Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells." *Oncogene* 23(55): 8979-86.
- Deng, L., C. Wang, et al. (2000). "Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain." *Cell* 103(2): 351-61.
- Deveraux, Q. L., E. Leo, et al. (1999). "Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases." *EMBO J* 18(19): 5242-51.
- Di, Y. P., E. A. Repasky, et al. (1997). "Distribution of HSP70, protein kinase C, and spectrin is altered in lymphocytes during a fever-like hyperthermia exposure." *J Cell Physiol* 172(1): 44-54.
- Dias, S., S. V. Shmelkov, et al. (2002). "VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition." *Blood* 99(7): 2532-40.
- Diaz, J. L., T. Oltersdorf, et al. (1997). "A common binding site mediates heterodimerization and homodimerization of Bcl-2 family members." *J Biol Chem* 272(17): 11350-5.
- Dickens, L. S., R. S. Boyd, et al. (2012). "A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death." *Mol Cell* 47(2): 291-305.
- Diehl, G. E., H. H. Yue, et al. (2004). "TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses." *Immunity* 21(6): 877-89.
- Diller, K. R. (2006). "Stress protein expression kinetics." *Annu Rev Biomed Eng* 8: 403-24.
- Dohrman, A., J. Q. Russell, et al. (2005). "Cellular FLIP long form augments caspase activity and death of T cells through heterodimerization with and activation of caspase-8." *J Immunol* 175(1): 311-8.
- Dorothee, G., I. Vergnon, et al. (2002). "Tumor-infiltrating CD4⁺ T lymphocytes express APO2 ligand (APO2L)/TRAIL upon specific stimulation with autologous lung carcinoma cells: role of IFN- α on APO2L/TRAIL expression and -mediated cytotoxicity." *J Immunol* 169(2): 809-17.
- Drummond, I. A. and R. A. Steinhardt (1987). "The role of oxidative stress in the induction of Drosophila heat-shock proteins." *Exp Cell Res* 173(2): 439-49.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* 102(1): 33-42.
- Dubois, M. F., A. G. Hovanessian, et al. (1991). "Heat-shock-induced denaturation of proteins. Characterization of the insolubilization of the interferon-induced p68 kinase." *J Biol Chem* 266(15): 9707-11.
- Dubrez-Daloz, L., A. Dupoux, et al. (2008). "IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins." *Cell Cycle* 7(8): 1036-46.
- Dusek, R. L., S. Getsios, et al. (2006). "The differentiation-dependent desmosomal cadherin desmoglein 1 is a novel caspase-3 target that regulates apoptosis in keratinocytes." *J Biol Chem* 281(6): 3614-24.
- Eberstadt, M., B. Huang, et al. (1998). "NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain." *Nature* 392(6679): 941-5.
- Eckelman, B. P. and G. S. Salvesen (2006b). "The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases." *J Biol Chem* 281(6): 3254-60.
- Eckelman, B. P., G. S. Salvesen, et al. (2006a). "Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family." *EMBO Rep* 7(10): 988-94.
- Edington, B. V., S. A. Whelan, et al. (1989). "Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional support for the abnormal protein hypothesis of induction." *J Cell Physiol* 139(2): 219-28.
- Eggert, A., M. A. Grotzer, et al. (2001). "Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression." *Cancer Res* 61(4): 1314-9.

- Ehrlich, S., C. Infante-Duarte, et al. (2003). "Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes." *Cytokine* 24(6): 244-53.
- Ehrnsperger, M., S. Graber, et al. (1997). "Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation." *EMBO J* 16(2): 221-9.
- Eichner, T. and S. E. Radford (2011). "A diversity of assembly mechanisms of a generic amyloid fold." *Mol Cell* 43(1): 8-18.
- El-Awady, R. A., E. Dikomey, et al. (2001). "Heat effects on DNA repair after ionising radiation: hyperthermia commonly increases the number of non-repaired double-strand breaks and structural rearrangements." *Nucleic Acids Res* 29(9): 1960-6.
- El-Sayed, I. H., X. Huang, et al. (2006). "Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles." *Cancer Lett* 239(1): 129-35.
- Ellis, J. (1987). "Proteins as molecular chaperones." *Nature* 328(6129): 378-9.
- Emery, J. G., P. McDonnell, et al. (1998). "Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." *J Biol Chem* 273(23): 14363-7.
- Enari, M., H. Sakahira, et al. (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." *Nature* 391(6662): 43-50.
- Entwistle, V. A., S. M. Carter, et al. (2010). "Supporting patient autonomy: the importance of clinician-patient relationships." *J Gen Intern Med* 25(7): 741-5.
- Eppink, B., P. M. Krawczyk, et al. (2012). "Hyperthermia-induced DNA repair deficiency suggests novel therapeutic anti-cancer strategies." *Int J Hyperthermia* 28(6): 509-17.
- Ernst, E. and B. R. Cassileth (1999). "How useful are unconventional cancer treatments?" *Eur J Cancer* 35(11): 1608-13.
- Eskes, R., S. Desagher, et al. (2000). "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane." *Mol Cell Biol* 20(3): 929-35.
- Eyigor, S. and S. Kanyilmaz (2014). "Exercise in patients coping with breast cancer: An overview." *World J Clin Oncol* 5(3): 406-11.
- Fabunmi, R. P., W. C. Wigley, et al. (2000). "Activity and regulation of the centrosome-associated proteasome." *J Biol Chem* 275(1): 409-13.
- Fackenthal, J. D. and O. I. Olopade (2007). "Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations." *Nat Rev Cancer* 7(12): 937-48.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." *J Immunol* 148(7): 2207-16.
- Faivre, J. and A. Giacosa (1998). "Primary prevention of colorectal cancer through fibre supplementation." *Eur J Cancer Prev* 7 Suppl 2: S29-32.
- Falschlehner, C., U. Schaefer, et al. (2009). "Following TRAIL's path in the immune system." *Immunology* 127(2): 145-54.
- Fang, F., A. P. Wang, et al. (2005). "Antitumor activity of a novel recombinant mutant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." *Acta Pharmacol Sin* 26(11): 1373-81.
- Fanger, N. A., C. R. Maliszewski, et al. (1999). "Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)." *J Exp Med* 190(8): 1155-64.
- Fekrazad, R., N. Hakimiha, et al. (2011). "Treatment of oral squamous cell carcinoma using anti-HER2 immunonanoshells." *Int J Nanomedicine* 6: 2749-55.
- Feoktistova, M., P. Geserick, et al. (2011). "cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms." *Mol Cell* 43(3): 449-63.
- Feoktistova, M., P. Geserick, et al. (2012). "Pick your poison: the Ripoptosome, a cell death platform regulating apoptosis and necroptosis." *Cell Cycle* 11(3): 460-7.
- Ferrone, F. (1999). "Analysis of protein aggregation kinetics." *Methods Enzymol* 309: 256-74.
- Finnberg, N., A. J. Klein-Szanto, et al. (2008). "TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis." *J Clin Invest* 118(1): 111-23.
- Forero-Torres, A., J. R. Infante, et al. (2013). "Phase 2, multicenter, open-label study of tigatuzumab (CS-1008), a humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5, in combination with gemcitabine in chemotherapy-naïve patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer." *Cancer Med* 2(6): 925-32.
- Forester, S. C. and J. D. Lambert (2010). "The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention." *Mol Nutr Food Res* 55(6): 844-54.
- Franckena, M., D. Fatehi, et al. (2009). "Hyperthermia dose-effect relationship in 420 patients with cervical cancer treated with combined radiotherapy and hyperthermia." *Eur J Cancer* 45(11): 1969-78.
- Frazer, I. H. (2009). "Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship." *Virology* 384(2): 410-4.

- Frey, B., E. M. Weiss, et al. (2012). "Old and new facts about hyperthermia-induced modulations of the immune system." *Int J Hyperthermia* 28(6): 528-42.
- Fulda, S. (2013). "Targeting c-FLICE-like inhibitory protein (CFLAR) in cancer." *Expert Opin Ther Targets* 17(2): 195-201.
- Gabai, V. L., J. A. Yaglom, et al. (2000). "Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death." *Mol Cell Biol* 20(18): 6826-36.
- Gaj, T., C. A. Gersbach, et al. (2013). "ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering." *Trends Biotechnol* 31(7): 397-405.
- Galban, S. and C. S. Duckett (2010). "XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling." *Cell Death Differ* 17(1): 54-60.
- Galen, D. I., R. R. Pemuelier, et al. (2011). "Laparoscopic Radiofrequency Fibroid Ablation: Phase II and Phase III Results." *JSLs* 18(2): 182-90.
- Gallegos, L. L. and J. S. Brugge (2014). "Live free or die: cell-cell adhesion regulates sensitivity to trail-induced apoptosis." *Dev Cell* 30(1): 3-4.
- Gallerne, C., A. Prola, et al. (2013). "Hsp90 inhibition by PU-H71 induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway in cancer cells and overcomes the resistance conferred by Bcl-2." *Biochim Biophys Acta* 1833(6): 1356-66.
- Galluzzi, L., M. C. Maiuri, et al. (2007). "Cell death modalities: classification and pathophysiological implications." *Cell Death Differ* 14(7): 1237-43.
- Gamerding, M., A. M. Kaya, et al. (2011). "BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins." *EMBO Rep* 12(2): 149-56.
- Ganea, E. (2001). "Chaperone-like activity of alpha-crystallin and other small heat shock proteins." *Curr Protein Pept Sci* 2(3): 205-25.
- Ganten, T. M., R. Koschny, et al. (2006). "Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs." *Clin Cancer Res* 12(8): 2640-6.
- Garcia-Mata, R., Z. Bebok, et al. (1999). "Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera." *J Cell Biol* 146(6): 1239-54.
- Garrido, C., J. M. Bruey, et al. (1999). "HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9." *FASEB J* 13(14): 2061-70.
- Garrido, C., M. Brunet, et al. (2006). "Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties." *Cell Cycle* 5(22): 2592-601.
- Gasparian, M. E., L. V. Domnina, et al. (2008). "Cytoskeleton inhibitors combined with TRAIL induce apoptosis in HeLa carcinoma cells overexpressing antiapoptotic protein Bcl-2." *Biochemistry (Mosc)* 73(3): 358-62.
- Genest, O., J. R. Hoskins, et al. (2013). "Heat shock protein 90 from Escherichia coli collaborates with the DnaK chaperone system in client protein remodeling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(20): 8206-11.
- Geng, C., J. Hou, et al. (2014). "A multicenter, open-label phase II study of recombinant CPT (Circularly Permuted TRAIL) plus thalidomide in patients with relapsed and refractory multiple myeloma." *Am J Hematol*.
- George, J. and Y. Shukla (2011). "Pesticides and cancer: insights into toxicoproteomic-based findings." *J Proteomics* 74(12): 2713-22.
- Gillissen, B., J. Wendt, et al. (2010). "Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma." *J Cell Biol* 188(6): 851-62.
- Gilot, D., A. L. Serandour, et al. (2005). "A role for caspase-8 and c-FLIPL in proliferation and cell-cycle progression of primary hepatocytes." *Carcinogenesis* 26(12): 2086-94.
- Goers, J., S. E. Permyakov, et al. (2002). "Conformational prerequisites for alpha-lactalbumin fibrillation." *Biochemistry* 41(41): 12546-51.
- Goltsev, Y. V., A. V. Kovalenko, et al. (1997). "CASH, a novel caspase homologue with death effector domains." *J Biol Chem* 272(32): 19641-4.
- Gong, J., S. A. Kumar, et al. (2013). "FLIP: Molecular Switch Between Apoptosis and Necroptosis." *Mol Carcinog*.
- Gonzalvez, F. and A. Ashkenazi (2010). "New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL." *Oncogene* 29(34): 4752-65.
- Greco, F. A., P. Bonomi, et al. (2008). "Phase 2 study of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody which targets and activates the TRAIL receptor-1, in patients with advanced non-small cell lung cancer." *Lung Cancer* 61(1): 82-90.
- Griffith, T. S., S. R. Wiley, et al. (1999). "Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL." *J Exp Med* 189(8): 1343-54.

- Groll, M., L. Ditzel, et al. (1997). "Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution." *Nature* 386(6624): 463-71.
- Gross, A., X. M. Yin, et al. (1999). "Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death." *J Biol Chem* 274(2): 1156-63.
- Grosse-Wilde, A. and C. J. Kemp (2008a). "Metastasis suppressor function of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-R in mice: implications for TRAIL-based therapy in humans?" *Cancer Res* 68(15): 6035-7.
- Grosse-Wilde, A., O. Voloshanenko, et al. (2008b). "TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development." *J Clin Invest* 118(1): 100-10.
- Guay, J., H. Lambert, et al. (1997). "Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27." *J Cell Sci* 110 (Pt 3): 357-68.
- Guo, F., C. Sigua, et al. (2005). "Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells." *Blood* 105(3): 1246-55.
- Gupta, R. S. and B. Singh (1994). "Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus." *Curr Biol* 4(12): 1104-14.
- Hadjipanayis, C. G., M. J. Bonder, et al. (2008). "Metallic iron nanoparticles for MRI contrast enhancement and local hyperthermia." *Small* 4(11): 1925-9.
- Hainfeld, J. F., L. Lin, et al. (2014). "Gold nanoparticle hyperthermia reduces radiotherapy dose." *Nanomedicine*.
- Halaas, O., R. Vik, et al. (2000). "Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages." *Scand J Immunol* 51(3): 244-50.
- Han, D. K., P. M. Chaudhary, et al. (1997). "MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(21): 11333-8.
- Han, J., L. A. Goldstein, et al. (2006). "Interrelated roles for Mcl-1 and BIM in regulation of TRAIL-mediated mitochondrial apoptosis." *J Biol Chem* 281(15): 10153-63.
- Han, S. I., S. Y. Oh, et al. (2002). "Mild heat shock induces cyclin D1 synthesis through multiple Ras signal pathways." *FEBS Lett* 515(1-3): 141-5.
- Han, S. I., S. Y. Oh, et al. (2001). "Implication of a small GTPase Rac1 in the activation of c-Jun N-terminal kinase and heat shock factor in response to heat shock." *J Biol Chem* 276(3): 1889-95.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-74.
- Hartl, F. U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding." *Nature* 381(6583): 571-9.
- Hartl, F. U., A. Bracher, et al. (2011). "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis." *Nature* 475(7356): 324-32.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl (2009). "Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo." *Nat Struct Mol Biol* 16(6): 574-81.
- Hase, J., K. Kobashi, et al. (1980). "The quaternary structure of carp muscle alkaline protease." *Biochim Biophys Acta* 611(1): 205-13.
- Hayakawa, Y., V. Screpanti, et al. (2004). "NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy." *J Immunol* 172(1): 123-9.
- Hayes, D., V. Napoli, et al. (2009). "Phosphorylation dependence of hsp27 multimeric size and molecular chaperone function." *J Biol Chem* 284(28): 18801-7.
- He, M. X. and Y. W. He (2013). "A role for c-FLIP(L) in the regulation of apoptosis, autophagy, and necroptosis in T lymphocytes." *Cell Death Differ* 20(2): 188-97.
- Heine, U., L. Sverak, et al. (1971). "The behavior of HeLa-S3 cells under the influence of supranormal temperatures." *J Ultrastruct Res* 34(3): 375-96.
- Heinrich, J. C., A. Tuukkanen, et al. (2011). "RP101 (brivudine) binds to heat shock protein HSP27 (HSPB1) and enhances survival in animals and pancreatic cancer patients." *J Cancer Res Clin Oncol* 137(9): 1349-61.
- Helfer, B., B. C. Boswell, et al. (2006). "Caspase-8 promotes cell motility and calpain activity under nonapoptotic conditions." *Cancer Res* 66(8): 4273-8.
- Hendrich, A. B. and K. Michalak (2003). "Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells." *Curr Drug Targets* 4(1): 23-30.
- Hendrickson, A. E., A. L. Oberg, et al. (2012). "A phase II study of gemcitabine in combination with tanespimycin in advanced epithelial ovarian and primary peritoneal carcinoma." *Gynecol Oncol* 124(2): 210-5.
- Henneghan, A. M. and T. Harrison (2014). "Complementary and Alternative Medicine Therapies as Symptom Management Strategies for the Late Effects of Breast Cancer Treatment." *J Holist Nurs*.

- Herbst, R. S., S. G. Eckhardt, et al. (2010). "Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer." *J Clin Oncol* 28(17): 2839-46.
- Hermisson, M., B. Wagenknecht, et al. (2000). "Sensitization to CD95 ligand-induced apoptosis in human glioma cells by hyperthermia involves enhanced cytochrome c release." *Oncogene* 19(19): 2338-45.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." *Annu Rev Biochem* 67: 425-79.
- Hershko, A., H. Heller, et al. (1983). "Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown." *J Biol Chem* 258(13): 8206-14.
- Hicke, L., H. L. Schubert, et al. (2005). "Ubiquitin-binding domains." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8): 610-21.
- Hickey, E. D. and L. A. Weber (1982). "Modulation of heat-shock polypeptide synthesis in HeLa cells during hyperthermia and recovery." *Biochemistry* 21(7): 1513-21.
- Hill, J. M., G. Morisawa, et al. (2004). "Identification of an expanded binding surface on the FADD death domain responsible for interaction with CD95/Fas." *J Biol Chem* 279(2): 1474-81.
- Hirano, A., H. Yoshikawa, et al. (2012). "Adsorption and disruption of lipid bilayers by nanoscale protein aggregates." *Langmuir* 28(8): 3887-95.
- Holmes, W. M., C. L. Klaips, et al. (2014). "Defining the limits: Protein aggregation and toxicity in vivo." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49(4): 294-303.
- Horneber, M., G. Bueschel, et al. (2012). "How many cancer patients use complementary and alternative medicine: a systematic review and metaanalysis." *Integr Cancer Ther* 11(3): 187-203.
- Hotte, S. J., H. W. Hirte, et al. (2008). "A phase 1 study of mapatumumab (fully human monoclonal antibody to TRAIL-R1) in patients with advanced solid malignancies." *Clin Cancer Res* 14(11): 3450-5.
- Hromadnikova, I., P. Pirkova, et al. (2013). "Influence of in vitro IL-2 or IL-15 alone or in combination with Hsp-70-derived 14-mer peptide (TKD) on the expression of NK cell activatory and inhibitory receptors." *Mediators Inflamm* 2013: 405295.
- Hsu, H., J. Xiong, et al. (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." *Cell* 81(4): 495-504.
- Huang, S. H., K. J. Yang, et al. (1999). "Effects of hyperthermia on the cytoskeleton and focal adhesion proteins in a human thyroid carcinoma cell line." *J Cell Biochem* 75(2): 327-37.
- Huang, Y. Y., H. Liu, et al. (2013). "Down-regulation of RIP1 by 2-deoxy-D-glucose sensitizes breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis." *Eur J Pharmacol* 705(1-3): 26-34.
- Hughes, M. A., N. Harper, et al. (2009). "Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival." *Mol Cell* 35(3): 265-79.
- Hundt, S., U. Haug, et al. (2007). "Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(10): 1935-53.
- Hymowitz, S. G., H. W. Christinger, et al. (1999). "Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5." *Mol Cell* 4(4): 563-71.
- Hymowitz, S. G., M. P. O'Connell, et al. (2000). "A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL." *Biochemistry* 39(4): 633-40.
- Imao, M., M. Nagaki, et al. (2006). "Dual effects of heat stress on tumor necrosis factor-alpha-induced hepatocyte apoptosis in mice." *Lab Invest* 86(9): 959-67.
- Ingolia, T. D. and E. A. Craig (1982). "Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(7): 2360-4.
- Inohara, N., T. Koseki, et al. (1997). "CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10717-22.
- Ishioka, T., R. Katayama, et al. (2007). "Impairment of the ubiquitin-proteasome system by cellular FLIP." *Genes Cells* 12(6): 735-44.
- Issels, R. D. (2008). "Hyperthermia adds to chemotherapy." *Eur J Cancer* 44(17): 2546-54.
- Issels, R. D., L. H. Lindner, et al. (2010). "Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study." *Lancet Oncol* 11(6): 561-70.
- Ito, H., I. Iwamoto, et al. (2005). "Endoplasmic reticulum stress induces the phosphorylation of small heat shock protein, Hsp27." *J Cell Biochem* 95(5): 932-41.
- Jahn, T. R. and S. E. Radford (2008). "Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways." *Arch Biochem Biophys* 469(1): 100-17.
- Jain, R. K. (2005). "Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy." *Science* 307(5706): 58-62.
- Jamrich, M., A. L. Greenleaf, et al. (1977). "Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(5): 2079-83.
- Jego, G., A. Hazoume, et al. (2012). "Targeting heat shock proteins in cancer." *Cancer Lett* 332(2): 275-85.

- Jeong, E. J., S. Bang, et al. (1999). "The solution structure of FADD death domain. Structural basis of death domain interactions of Fas and FADD." *J Biol Chem* 274(23): 16337-42.
- Jhaveri, K. and S. Modi (2012). "HSP90 inhibitors for cancer therapy and overcoming drug resistance." *Adv Pharmacol* 65: 471-517.
- Jia, B., Y. Wu, et al. (2014). "14-3-3 and aggresome formation: implications in neurodegenerative diseases." *Prion* 8(2).
- Jiang, M., Z. Liu, et al. (2011a). "Synergistic antitumor effect of AAV-mediated TRAIL expression combined with cisplatin on head and neck squamous cell carcinoma." *BMC Cancer* 11: 54.
- Jiang, W., L. Bian, et al. (2011b). "Hyperthermia-induced apoptosis in Tca8113 cells is inhibited by heat shock protein 27 through blocking phospholipid scramblase 3 phosphorylation." *Int J Hyperthermia* 26(6): 523-37.
- Jin, L., A. Williamson, et al. (2008). "Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex." *Cell* 133(4): 653-65.
- Jin, T. G., A. Kurakin, et al. (2004). "Fas-associated protein with death domain (FADD)-independent recruitment of c-FLIPL to death receptor 5." *J Biol Chem* 279(53): 55594-601.
- Jin, Z. and W. S. El-Deiry (2006). "Distinct signaling pathways in TRAIL- versus tumor necrosis factor-induced apoptosis." *Mol Cell Biol* 26(21): 8136-48.
- Jin, Z., Y. Li, et al. (2009). "Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling." *Cell* 137(4): 721-35.
- Johnson, J. L. (2012). "Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins." *Biochim Biophys Acta* 1823(3): 607-13.
- Johnston, J. A., C. L. Ward, et al. (1998). "Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins." *J Cell Biol* 143(7): 1883-98.
- Jolesch, A., K. Elmer, et al. (2012). "Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system." *Eur J Cell Biol* 91(1): 48-52.
- Jones, E. L., J. R. Oleson, et al. (2005). "Randomized trial of hyperthermia and radiation for superficial tumors." *J Clin Oncol* 23(13): 3079-85.
- Jouan-Lanhuet, S., M. I. Arshad, et al. (2012). "TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation." *Cell Death Differ* 19(12): 2003-14.
- Jucker, M. and L. C. Walker (2013). "Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases." *Nature* 501(7465): 45-51.
- Kaaks, R., A. Lukanova, et al. (2002). "Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11(12): 1531-43.
- Kakio, A., Y. Yano, et al. (2004). "Interaction between amyloid beta-protein aggregates and membranes." *J Pept Sci* 10(10): 612-21.
- Kamal, A., L. Thao, et al. (2003). "A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors." *Nature* 425(6956): 407-10.
- Kaminuma, O., M. Deckert, et al. (2001). "Vav-Rac1-mediated activation of the c-Jun N-terminal kinase/c-Jun/AP-1 pathway plays a major role in stimulation of the distal NFAT site in the interleukin-2 gene promoter." *Mol Cell Biol* 21(9): 3126-36.
- Kampinga, H. H., J. Hageman, et al. (2009). "Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins." *Cell Stress Chaperones* 14(1): 105-11.
- Kanayama, A., R. B. Seth, et al. (2004). "TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains." *Mol Cell* 15(4): 535-48.
- Kato, K., H. Ito, et al. (2001). "Protein kinase inhibitors can suppress stress-induced dissociation of Hsp27." *Cell Stress Chaperones* 6(1): 16-20.
- Kaunisto, A., V. Kochin, et al. (2009). "PKC-mediated phosphorylation regulates c-FLIP ubiquitylation and stability." *Cell Death Differ* 16(9): 1215-26.
- Kayagaki, N., N. Yamaguchi, et al. (1999b). "Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs." *J Exp Med* 189(9): 1451-60.
- Kayagaki, N., N. Yamaguchi, et al. (1999a). "Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity." *J Immunol* 162(5): 2639-47.
- Kelley, R. F., K. Totpal, et al. (2005). "Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling." *J Biol Chem* 280(3): 2205-12.
- Kelley, S. K., L. A. Harris, et al. (2001). "Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety." *J Pharmacol Exp Ther* 299(1): 31-8.

- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-57.
- Khurana, R., J. R. Gillespie, et al. (2001). "Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates." *Biochemistry* 40(12): 3525-35.
- Kim, C. Y., S. H. Park, et al. (2011b). "Preclinical studies for pharmacokinetics and biodistribution of Ad- Δ TRAIL, an adenovirus delivering secretable trimeric TRAIL for gene therapy." *Exp Mol Med* 43(10): 580-6.
- Kim, H., M. Rafiuddin-Shah, et al. (2006). "Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies." *Nat Cell Biol* 8(12): 1348-58.
- Kim, J., D. Kang, et al. (2013). "TRAIL/MEKK4/p38/HSP27/Akt survival network is biphasically modulated by the Src/CIN85/c-Cbl complex." *Cell Signal* 25(1): 372-9.
- Kim, J., S. Y. Kim, et al. (2012b). "HSP27 modulates survival signaling networks in cells treated with curcumin and TRAIL." *Cell Signal* 24(7): 1444-52.
- Kim, K. K., R. Kim, et al. (1998). "Crystal structure of a small heat-shock protein." *Nature* 394(6693): 595-9.
- Kim, R., M. Emi, et al. (2007). "Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape." *Immunology* 121(1): 1-14.
- Kim, T. H., Y. S. Youn, et al. (2011a). "PEGylated TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) analogues: pharmacokinetics and antitumor effects." *Bioconjug Chem* 22(8): 1631-7.
- Kim, T. S., C. Y. Jang, et al. (2006). "Interaction of Hsp90 with ribosomal proteins protects from ubiquitination and proteasome-dependent degradation." *Mol Biol Cell* 17(2): 824-33.
- Kim, Y. J., S. A. Lee, et al. (2012a). "Radicicol, an inhibitor of Hsp90, enhances TRAIL-induced apoptosis in human epithelial ovarian carcinoma cells by promoting activation of apoptosis-related proteins." *Mol Cell Biochem* 359(1-2): 33-43.
- Kimberley, F. C. and G. R. Screaton (2004). "Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors." *Cell Res* 14(5): 359-72.
- Kinnunen, P. K. (1991). "On the principles of functional ordering in biological membranes." *Chem Phys Lipids* 57(2-3): 375-99.
- Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, et al. (2000). "Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5." *Immunity* 12(6): 611-20.
- Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, et al. (2001). "Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8." *J Biol Chem* 276(49): 46639-46.
- Klafke, N., J. A. Elliott, et al. (2014). "Australian men with cancer practice complementary therapies (CTs) as a coping strategy." *Psychooncology*.
- Kleinjung, T., O. Arndt, et al. (2003). "Heat shock protein 70 (Hsp70) membrane expression on head-and-neck cancer biopsy-a target for natural killer (NK) cells." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57(3): 820-6.
- Kock, N., R. Kasmieh, et al. (2007). "Tumor therapy mediated by lentiviral expression of shBcl-2 and S-TRAIL." *Neoplasia* 9(5): 435-42.
- Kodali, R. and R. Wetzel (2007). "Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly." *Curr Opin Struct Biol* 17(1): 48-57.
- Koga, Y., A. Matsuzaki, et al. (2004). "Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils." *Cancer Res* 64(3): 1037-43.
- Kominami, K., T. Nagai, et al. (2012). "In vivo imaging of hierarchical spatiotemporal activation of caspase-8 during apoptosis." *PLoS One* 7(11): e50218.
- Koornstra, J. J., J. H. Kleibeuker, et al. (2003). "Expression of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) and its receptors in normal colonic mucosa, adenomas, and carcinomas." *J Pathol* 200(3): 327-35.
- Kothakota, S., T. Azuma, et al. (1997). "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis." *Science* 278(5336): 294-8.
- Kranz, D. and M. Boutros (2014). "A synthetic lethal screen identifies FAT1 as an antagonist of caspase-8 in extrinsic apoptosis." *EMBO J*.
- Kreuz, S., D. Siegmund, et al. (2001). "NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling." *Mol Cell Biol* 21(12): 3964-73.
- Krishnan, A. V., D. L. Trump, et al. (2010). "The role of vitamin D in cancer prevention and treatment." *Endocrinol Metab Clin North Am* 39(2): 401-18, table of contents.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." *Physiol Rev* 87(1): 99-163.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell Death Differ* 16(1): 3-11.
- Kuang, A. A., G. E. Diehl, et al. (2000). "FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts." *J Biol Chem* 275(33): 25065-8.

- Kumar, A. and A. Dhawan (2013). "Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: an update." *Arch Toxicol* 87(11): 1883-900.
- Kumar, L. V. and C. M. Rao (2000). "Domain swapping in human alpha A and alpha B crystallins affects oligomerization and enhances chaperone-like activity." *J Biol Chem* 275(29): 22009-13.
- Kundu, M., S. K. Pathak, et al. (2009). "A TNF- and c-Cbl-dependent FLIP(S)-degradation pathway and its function in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage apoptosis." *Nat Immunol* 10(8): 918-26.
- Kunjithapatham, R., F. Y. Oliva, et al. (2005). "Role for the alpha-helix in aberrant protein aggregation." *Biochemistry* 44(1): 149-56.
- Lamark, T. and T. Johansen (2012). "Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy." *Int J Cell Biol* 2012: 736905.
- Lamhamedi-Cherradi, S. E., S. J. Zheng, et al. (2003). "Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice." *Nat Immunol* 4(3): 255-60.
- Lanneau, D., A. de Thonel, et al. (2007). "Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27." *Prion* 1(1): 53-60.
- Lawrence, D., Z. Shahrokh, et al. (2001). "Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions." *Nat Med* 7(4): 383-5.
- LeBlanc, H., D. Lawrence, et al. (2002). "Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax." *Nat Med* 8(3): 274-81.
- Lee, C. and V. D. Longo (2011). "Fasting vs dietary restriction in cellular protection and cancer treatment: from model organisms to patients." *Oncogene* 30(30): 3305-16.
- Lee, J. H., J. Gao, et al. (2013). "Heat shock protein 90 (HSP90) inhibitors activate the heat shock factor 1 (HSF1) stress response pathway and improve glucose regulation in diabetic mice." *Biochem Biophys Res Commun* 430(3): 1109-13.
- Lee, J. S., J. J. Lee, et al. (2005). "HSP70 deficiency results in activation of c-Jun N-terminal Kinase, extracellular signal-regulated kinase, and caspase-3 in hyperosmolarity-induced apoptosis." *J Biol Chem* 280(8): 6634-41.
- Lee, T., S. J. Kim, et al. (2003). "Role of PP2A in the regulation of p38 MAPK activation in bovine aortic endothelial cells exposed to cyclic strain." *J Cell Physiol* 194(3): 349-55.
- Lejeune, F. J., C. Ruegg, et al. (1998). "Clinical applications of TNF-alpha in cancer." *Curr Opin Immunol* 10(5): 573-80.
- Leij-Garolla, B. and A. G. Mauk (2005). "Self-association of a small heat shock protein." *J Mol Biol* 345(3): 631-42.
- Lepock, J. R. (2003). "Cellular effects of hyperthermia: relevance to the minimum dose for thermal damage." *Int J Hyperthermia* 19(3): 252-66.
- Lepock, J. R. (2004). "Role of nuclear protein denaturation and aggregation in thermal radiosensitization." *Int J Hyperthermia* 20(2): 115-30.
- Lepock, J. R., H. E. Frey, et al. (2001). "The nuclear matrix is a thermolabile cellular structure." *Cell Stress Chaperones* 6(2): 136-47.
- Levy, Y. and J. N. Onuchic (2006). "Water mediation in protein folding and molecular recognition." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35: 389-415.
- Li, F. Y., P. D. Jeffrey, et al. (2006). "Crystal structure of a viral FLIP: insights into FLIP-mediated inhibition of death receptor signaling." *J Biol Chem* 281(5): 2960-8.
- Li, J., Q. Yin, et al. (2013). "Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily." *Adv Immunol* 119: 135-53.
- Li, J. L., H. L. Liu, et al. (2009). "A phase I trial of intratumoral administration of recombinant oncolytic adenovirus overexpressing HSP70 in advanced solid tumor patients." *Gene Ther* 16(3): 376-82.
- Li, L. Y., X. Luo, et al. (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." *Nature* 412(6842): 95-9.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." *Cell* 91(4): 479-89.
- Liapi, E. and J. F. Geschwind (2007). "Transcatheter and ablative therapeutic approaches for solid malignancies." *J Clin Oncol* 25(8): 978-86.
- Liaw, K. L., A. Hildesheim, et al. (2001). "A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types." *J Infect Dis* 183(1): 8-15.
- Lin, R. Z., Z. W. Hu, et al. (1997). "Heat shock activates c-Src tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in NIH3T3 fibroblasts." *J Biol Chem* 272(49): 31196-202.
- Lin, Y., A. Devin, et al. (2000). "The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of I κ B kinase and c-Jun N-terminal kinase." *Mol Cell Biol* 20(18): 6638-45.
- Lindquist, S. and E. A. Craig (1988). "The heat-shock proteins." *Annu Rev Genet* 22: 631-77.

- Liu, C. C., H. I. Miller, et al. (1989). "Purification of a ubiquitin protein peptidase from yeast with efficient in vitro assays." *J Biol Chem* 264(34): 20331-8.
- Lomakin, A., D. B. Teplow, et al. (1997). "Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid beta-protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(15): 7942-7.
- Los, D. A. and N. Murata (2000). "Regulation of enzymatic activity and gene expression by membrane fluidity." *Sci STKE* 2000(62): pe1.
- Los, D. A. and N. Murata (2004). "Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals." *Biochim Biophys Acta* 1666(1-2): 142-57.
- Lovell, J. F., L. P. Billen, et al. (2008). "Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax." *Cell* 135(6): 1074-84.
- Lu, X., L. Xiao, et al. (2012). "Hsp90 inhibitors and drug resistance in cancer: the potential benefits of combination therapies of Hsp90 inhibitors and other anti-cancer drugs." *Biochem Pharmacol* 83(8): 995-1004.
- Ma, Y., V. Lakshmikanthan, et al. (2006). "Sensitization of TRAIL-resistant cells by inhibition of heat shock protein 90 with low-dose geldanamycin." *Mol Cancer Ther* 5(1): 170-8.
- MacFarlane, M., S. L. Kohlhaas, et al. (2005). "TRAIL receptor-selective mutants signal to apoptosis via TRAIL-R1 in primary lymphoid malignancies." *Cancer Res* 65(24): 11265-70.
- Maher, S. G., A. L. Romero-Weaver, et al. (2007). "Interferon: cellular executioner or white knight?" *Curr Med Chem* 14(12): 1279-89.
- Majkut, J., M. Sgobba, et al. (2014). "Differential affinity of FLIP and procaspase 8 for FADD's DED binding surfaces regulates DISC assembly." *Nat Commun* 5: 3350.
- Malladi, S., M. Challa-Malladi, et al. (2009). "The Apaf-1*procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer." *EMBO J* 28(13): 1916-25.
- Mandal, D., P. K. Moitra, et al. (2002). "Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes." *FEBS Lett* 513(2-3): 184-8.
- Mannini, B., R. Cascella, et al. (2012). "Molecular mechanisms used by chaperones to reduce the toxicity of aberrant protein oligomers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(31): 12479-84.
- Marconi, M., B. Ascione, et al. (2013). "Constitutive localization of DR4 in lipid rafts is mandatory for TRAIL-induced apoptosis in B-cell hematologic malignancies." *Cell Death Dis* 4: e863.
- Mariani, S. M. and P. H. Krammer (1998). "Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage." *Eur J Immunol* 28(3): 973-82.
- Markov, D. I., A. V. Pivovarova, et al. (2008). "Small heat shock protein Hsp27 protects myosin S1 from heat-induced aggregation, but not from thermal denaturation and ATPase inactivation." *FEBS Lett* 582(10): 1407-12.
- Marsters, S. A., J. P. Sheridan, et al. (1997). "A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain." *Curr Biol* 7(12): 1003-6.
- Martinon, F. and J. Tschopp (2007). "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation." *Cell Death Differ* 14(1): 10-22.
- Matsuda, I., K. Matsuo, et al. (2014). "The C-terminal domain of the long form of cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIPL) inhibits the interaction of the caspase 8 prodomain with the receptor-interacting protein 1 (RIP1) death domain and regulates caspase 8-dependent nuclear factor kappaB (NF-kappaB) activation." *J Biol Chem* 289(7): 3876-87.
- Mattoo, R. U., S. K. Sharma, et al. (2013). "Hsp110 is a bona fide chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with Hsp70 to solubilize protein aggregates." *J Biol Chem* 288(29): 21399-411.
- Mayer, M. P. (2013). "Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism." *Trends Biochem Sci* 38(10): 507-14.
- McClellan, A. J., Y. Xia, et al. (2007). "Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches." *Cell* 131(1): 121-35.
- McComb, S., H. H. Cheung, et al. (2012). "cIAP1 and cIAP2 limit macrophage necroptosis by inhibiting Rip1 and Rip3 activation." *Cell Death Differ* 19(11): 1791-801.
- McIlroy, D., H. Sakahira, et al. (1999). "Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli." *Oncogene* 18(31): 4401-8.
- McIlwain, D. R., T. Berger, et al. (2013). "Caspase functions in cell death and disease." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(4): a008656.
- Mehlen, P., E. Hickey, et al. (1997). "Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells." *Biochem Biophys Res Commun* 241(1): 187-92.

- Mehlen, P., K. Schulze-Osthoff, et al. (1996). "Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death." *J Biol Chem* 271(28): 16510-4.
- Meinander, A., T. S. Soderstrom, et al. (2007). "Fever-like hyperthermia controls T Lymphocyte persistence by inducing degradation of cellular FLIPshort." *J Immunol* 178(6): 3944-53.
- Meldrum, K. K., D. R. Meldrum, et al. (2001). "Heat shock prevents simulated ischemia-induced apoptosis in renal tubular cells via a PKC-dependent mechanism." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281(1): R359-64.
- Mellier, G., D. Liu, et al. (2013). "Small molecule sensitization to TRAIL is mediated via nuclear localization, phosphorylation and inhibition of chaperone activity of Hsp27." *Cell Death Dis* 4: e890.
- Metzger, M. B., J. N. Pruneda, et al. (2014). "RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination." *Biochim Biophys Acta* 1843(1): 47-60.
- Meurette, O., A. Rebillard, et al. (2007). "TRAIL induces receptor-interacting protein 1-dependent and caspase-dependent necrosis-like cell death under acidic extracellular conditions." *Cancer Res* 67(1): 218-26.
- Micheau, O., S. Lens, et al. (2001). "NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP." *Mol Cell Biol* 21(16): 5299-305.
- Micheau, O., S. Shirley, et al. (2013). "Death receptors as targets in cancer." *Br J Pharmacol*.
- Micheau, O., M. Thome, et al. (2002). "The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex." *J Biol Chem* 277(47): 45162-71.
- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." *Cell* 114(2): 181-90.
- Mifflin, L. C. and R. E. Cohen (1994). "Characterization of denatured protein inducers of the heat shock (stress) response in *Xenopus laevis* oocytes." *J Biol Chem* 269(22): 15710-7.
- Milani, V., E. Noessner, et al. (2002). "Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation." *Int J Hyperthermia* 18(6): 563-75.
- Milazzo, S., E. Ernst, et al. (2011). "Laetrile treatment for cancer." *Cochrane Database Syst Rev*(11): CD005476.
- Milhas, D., O. Cu villier, et al. (2005). "Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis." *J Biol Chem* 280(20): 19836-42.
- Miot, M., M. Reidy, et al. (2011). "Species-specific collaboration of heat shock proteins (Hsp) 70 and 100 in thermotolerance and protein disaggregation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(17): 6915-20.
- Mirandola, P., C. Ponti, et al. (2004). "Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity." *Blood* 104(8): 2418-24.
- Miyata, Y., H. Nakamoto, et al. (2013). "The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks." *Curr Pharm Des* 19(3): 347-65.
- Modi, S., A. Stopeck, et al. (2011). "HSP90 inhibition is effective in breast cancer: a phase II trial of tanespimycin (17-AAG) plus trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing on trastuzumab." *Clin Cancer Res* 17(15): 5132-9.
- Monma, H., N. Harashima, et al. (2013). "The HSP70 and autophagy inhibitor pifithrin-mu enhances the antitumor effects of TRAIL on human pancreatic cancer." *Mol Cancer Ther* 12(4): 341-51.
- Moolgavkar, S. H. and A. G. Knudson, Jr. (1981). "Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis." *J Natl Cancer Inst* 66(6): 1037-52.
- Morizot, A., D. Merino, et al. (2011). "Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level." *Cell Death Differ* 18(4): 700-11.
- Moulin, M. and A. P. Arrigo (2008). "Caspases activation in hyperthermia-induced stimulation of TRAIL apoptosis." *Cell Stress Chaperones* 13(3): 313-26.
- Moulin, M. and A. P. Arrigo (2006). "Long lasting heat shock stimulation of TRAIL-induced apoptosis in transformed T lymphocytes." *Exp Cell Res* 312(10): 1765-84.
- Moulin, M., C. Dumontet, et al. (2007a). "Sensitization of chronic lymphocytic leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis by hyperthermia." *Cancer Lett* 250(1): 117-27.
- Moulin, M., S. Carpentier, et al. (2007b). "Potential roles of membrane fluidity and ceramide in hyperthermia and alcohol stimulation of TRAIL apoptosis." *Apoptosis* 12(9): 1703-20.
- Mukhopadhyay, D. and H. Riezman (2007). "Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling." *Science* 315(5809): 201-5.
- Muller, N., B. Schneider, et al. (2010). "Superior serum half life of albumin tagged TNF ligands." *Biochem Biophys Res Commun* 396(4): 793-9.

- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, et al. (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex." *Cell* 85(6): 817-27.
- Na, H. K. and S. Oliynyk (2011). "Effects of physical activity on cancer prevention." *Ann N Y Acad Sci* 1229: 176-83.
- Nadin, S. B., F. D. Cuello-Carrion, et al. (2012). "Effects of hyperthermia on Hsp27 (HSPB1), Hsp72 (HSPA1A) and DNA repair proteins hMLH1 and hMSH2 in human colorectal cancer hMLH1-deficient and hMLH1-proficient cell lines." *Int J Hyperthermia* 28(3): 191-201.
- Nagaraja, G. M., P. Kaur, et al. (2010). "Silencing Hsp25/Hsp27 gene expression augments proteasome activity and increases CD8+ T-cell-mediated tumor killing and memory responses." *Cancer Prev Res (Phila)* 5(1): 122-37.
- Nakahata, K., M. Miyakoda, et al. (2002). "Heat shock induces centrosomal dysfunction, and causes non-apoptotic mitotic catastrophe in human tumour cells." *Int J Hyperthermia* 18(4): 332-43.
- Negrini, S., V. G. Gorgoulis, et al. (2010). "Genomic instability--an evolving hallmark of cancer." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(3): 220-8.
- Nesterov, A., M. Nikrad, et al. (2004). "Oncogenic Ras sensitizes normal human cells to tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis." *Cancer Res* 64(11): 3922-7.
- Neville-Webbe, H. L., N. A. Cross, et al. (2004). "Osteoprotegerin (OPG) produced by bone marrow stromal cells protects breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis." *Breast Cancer Res Treat* 86(3): 269-79.
- Nguyen, V. T., M. Morange, et al. (1989). "Protein denaturation during heat shock and related stress. Escherichia coli beta-galactosidase and Photinus pyralis luciferase inactivation in mouse cells." *J Biol Chem* 264(18): 10487-92.
- Nicholson, D. W., A. Ali, et al. (1995). "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis." *Nature* 376(6535): 37-43.
- Niemoeller, O. M. and C. Belka (2013). "Radiotherapy and TRAIL for cancer therapy." *Cancer Lett* 332(2): 184-93.
- Nivon, M., M. Abou-Samra, et al. (2012). "NF-kappaB regulates protein quality control after heat stress through modulation of the BAG3-HspB8 complex." *J Cell Sci* 125(Pt 5): 1141-51.
- Nollen, E. A., J. F. Brunsting, et al. (1999). "In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance." *Mol Cell Biol* 19(3): 2069-79.
- Norbury, C. J. and B. Zhivotovsky (2004). "DNA damage-induced apoptosis." *Oncogene* 23(16): 2797-808.
- Nunez, G., M. A. Benedict, et al. (1998). "Caspases: the proteases of the apoptotic pathway." *Oncogene* 17(25): 3237-45.
- Nussbaum, A. K., T. P. Dick, et al. (1998). "Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21): 12504-9.
- Oberst, A., C. P. Dillon, et al. (2011). "Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis." *Nature* 471(7338): 363-7.
- Omi, K., N. S. Hachiya, et al. (2008). "14-3-3zeta is indispensable for aggregate formation of polyglutamine-expanded huntingtin protein." *Neurosci Lett* 431(1): 45-50.
- Orlowski, M., C. Cardozo, et al. (1997). "Reactions of [14C]-3,4-dichloroisocoumarin with subunits of pituitary and spleen multicatalytic proteinase complexes (proteasomes)." *Biochemistry* 36(45): 13946-53.
- Orlowski, M., C. Cardozo, et al. (1991). "Regulation of the peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex." *Biochemistry* 30(24): 5999-6005.
- Pacey, S., M. Gore, et al. (2012). "A Phase II trial of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) in patients with metastatic melanoma." *Invest New Drugs* 30(1): 341-9.
- Palacios, C., A. I. Lopez-Perez, et al. (2010). "Down-regulation of RIP expression by 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin promotes TRAIL-induced apoptosis in breast tumor cells." *Cancer Lett* 287(2): 207-15.
- Palacios, C., R. Yerbes, et al. (2006). "Flavopiridol induces cellular FLICE-inhibitory protein degradation by the proteasome and promotes TRAIL-induced early signaling and apoptosis in breast tumor cells." *Cancer Res* 66(17): 8858-69.
- Pan, G., J. Ni, et al. (1997a). "An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL." *Science* 277(5327): 815-8.
- Pan, G., J. Ni, et al. (1998). "TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling." *FEBS Lett* 424(1-2): 41-5.
- Pan, G., K. O'Rourke, et al. (1997b). "The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." *Science* 276(5309): 111-3.
- Panner, A., J. C. Murray, et al. (2007). "Heat shock protein 90alpha recruits FLIPS to the death-inducing signaling complex and contributes to TRAIL resistance in human glioma." *Cancer Res* 67(19): 9482-9.

- Papa, F. R. and M. Hochstrasser (1993). "The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene." *Nature* 366(6453): 313-9.
- Parcellier, A., M. Brunet, et al. (2006). "HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells." *FASEB J* 20(8): 1179-81.
- Parcellier, A., E. Schmitt, et al. (2003). "HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation." *Mol Cell Biol* 23(16): 5790-802.
- Park, E. J., K. S. Choi, et al. (2013). "Nutlin-3, a small-molecule MDM2 inhibitor, sensitizes Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through p53-mediated PUMA upregulation and ROS-mediated DR5 upregulation." *Anticancer Drugs* 24(3): 260-9.
- Park, H. G., S. I. Han, et al. (2005). "Cellular responses to mild heat stress." *Cell Mol Life Sci* 62(1): 10-23.
- Park, J. and A. Y. Liu (2001). "JNK phosphorylates the HSF1 transcriptional activation domain: role of JNK in the regulation of the heat shock response." *J Cell Biochem* 82(2): 326-38.
- Parkin, D. M. and F. Bray (2006). "Chapter 2: The burden of HPV-related cancers." *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/11-25.
- Patel, Y. J., M. D. Payne Smith, et al. (2005). "Hsp27 and Hsp70 administered in combination have a potent protective effect against FALS-associated SOD1-mutant-induced cell death in mammalian neuronal cells." *Brain Res Mol Brain Res* 134(2): 256-74.
- Paul, C., F. Manero, et al. (2002). "Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release." *Mol Cell Biol* 22(3): 816-34.
- Paul, C., S. Simon, et al. (2010). "Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27)." *Exp Cell Res* 316(9): 1535-52.
- Pearl, L. H. and C. Prodromou (2006). "Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery." *Annu Rev Biochem* 75: 271-94.
- Pellegrini, M., S. Bath, et al. (2005). "FADD and caspase-8 are required for cytokine-induced proliferation of hemopoietic progenitor cells." *Blood* 106(5): 1581-9.
- Pereira, P. L. (2007). "Actual role of radiofrequency ablation of liver metastases." *Eur Radiol* 17(8): 2062-70.
- Perlstein, B., S. A. Finniss, et al. (2013). "TRAIL conjugated to nanoparticles exhibits increased anti-tumor activities in glioma cells and glioma stem cells in vitro and in vivo." *Neuro Oncol* 15(1): 29-40.
- Petroi, D., B. Popova, et al. (2012). "Aggregate clearance of alpha-synuclein in *Saccharomyces cerevisiae* depends more on autophagosome and vacuole function than on the proteasome." *J Biol Chem* 287(33): 27567-79.
- Pitti, R. M., S. A. Marsters, et al. (1996). "Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family." *J Biol Chem* 271(22): 12687-90.
- Platt, N., R. P. da Silva, et al. (1998). "Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells." *Trends Cell Biol* 8(9): 365-72.
- Plummer, R., G. Attard, et al. (2007). "Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers." *Clin Cancer Res* 13(20): 6187-94.
- Polajnar, M., S. Ceru, et al. (2012). "Human stefin B normal and patho-physiological role: molecular and cellular aspects of amyloid-type aggregation of certain EPM1 mutants." *Front Mol Neurosci* 5: 88.
- Pollard, T. D. (2003). "The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda." *Nature* 422(6933): 741-5.
- Porta, C., C. Paglino, et al. (2014). "Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer." *Front Oncol* 4: 64.
- Porter, A. G. and R. U. Janicke (1999). "Emerging roles of caspase-3 in apoptosis." *Cell Death Differ* 6(2): 99-104.
- Poukkula, M., A. Kaunisto, et al. (2005). "Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its unique C-terminal tail." *J Biol Chem* 280(29): 27345-55.
- Presta, L. G. (2002). "Engineering antibodies for therapy." *Curr Pharm Biotechnol* 3(3): 237-56.
- Qu, X., C. Yao, et al. (2012). "Anti-CD30-targeted gold nanoparticles for photothermal therapy of L-428 Hodgkin's cell." *Int J Nanomedicine* 7: 6095-103.
- Raasi, S., R. Varadan, et al. (2005). "Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains." *Nat Struct Mol Biol* 12(8): 708-14.
- Raffaghello, L., F. Safdie, et al. (2010). "Fasting and differential chemotherapy protection in patients." *Cell Cycle* 9(22): 4474-6.
- Rao, R. V., E. Hermel, et al. (2001). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation." *J Biol Chem* 276(36): 33869-74.
- Rastelli, G., Z. Q. Tian, et al. (2005). "Structure-based design of 7-carbamate analogs of geldanamycin." *Bioorg Med Chem Lett* 15(22): 5016-21.
- Ravagnan, L., S. Gurbuxani, et al. (2001). "Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor." *Nat Cell Biol* 3(9): 839-43.

- Read, S. A. and M. W. Douglas (2014). "Virus induced inflammation and cancer development." *Cancer Lett* 345(2): 174-81.
- Rerole, A. L., J. Gobbo, et al. (2011). "Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anticancer chemotherapy." *Cancer Res* 71(2): 484-95.
- Ricci, M. S., Z. Jin, et al. (2004). "Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity." *Mol Cell Biol* 24(19): 8541-55.
- Richter, K., M. Haslbeck, et al. (2010). "The heat shock response: life on the verge of death." *Mol Cell* 40(2): 253-66.
- Riedl, S. J., M. Renatus, et al. (2001). "Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP." *Cell* 104(5): 791-800.
- Ritossa, P. (1962). *Riv Ist Sieroter Ital* 37: 79-108.
- Roberts, C. J. (2007). "Non-native protein aggregation kinetics." *Biotechnol Bioeng* 98(5): 927-38.
- Robertson, N. M., J. G. Zangrilli, et al. (2002). "Differential expression of TRAIL and TRAIL receptors in allergic asthmatics following segmental antigen challenge: evidence for a role of TRAIL in eosinophil survival." *J Immunol* 169(10): 5986-96.
- Rocchi, P., P. Jugpal, et al. (2006). "Small interference RNA targeting heat-shock protein 27 inhibits the growth of prostatic cell lines and induces apoptosis via caspase-3 activation in vitro." *BJU Int* 98(5): 1082-9.
- Rogalla, T., M. Ehrnsperger, et al. (1999). "Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation." *J Biol Chem* 274(27): 18947-56.
- Rossin, A., M. Derouet, et al. (2009). "Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling." *Biochem J* 419(1): 185-92, 2 p following 192.
- Roti Roti, J. L., H. H. Kampinga, et al. (1998). "Nuclear matrix as a target for hyperthermic killing of cancer cells." *Cell Stress Chaperones* 3(4): 245-55.
- Rouse, J., P. Cohen, et al. (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." *Cell* 78(6): 1027-37.
- Ryan, M. C., E. M. Shooter, et al. (2002). "Aggresome formation in neuropathy models based on peripheral myelin protein 22 mutations." *Neurobiol Dis* 10(2): 109-18.
- Saibil, H. (2014). "Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(10): 630-42.
- Sakahira, H. and S. Nagata (2002). "Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase." *J Biol Chem* 277(5): 3364-70.
- Sakkers, R. J., A. R. Filon, et al. (1995). "Selective inhibition of repair of active genes by hyperthermia is due to inhibition of global and transcription coupled repair pathways." *Carcinogenesis* 16(4): 743-8.
- Salon, C., B. Eymin, et al. (2006). "E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short)." *Cell Death Differ* 13(2): 260-72.
- Salvesen, G. S. and V. M. Dixit (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 10964-7.
- Sasahara, K., K. Morigaki, et al. (2013). "Effects of membrane interaction and aggregation of amyloid beta-peptide on lipid mobility and membrane domain structure." *Phys Chem Chem Phys* 15(23): 8929-39.
- Sato, I., M. Umemura, et al. (2014). "Hyperthermia generated with ferucarbotran (Resovist) in an alternating magnetic field enhances cisplatin-induced apoptosis of cultured human oral cancer cells." *J Physiol Sci*.
- Sattler, M., H. Liang, et al. (1997). "Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis." *Science* 275(5302): 983-6.
- Saturno, G., M. Valenti, et al. (2013). "Combining trail with PI3 kinase or HSP90 inhibitors enhances apoptosis in colorectal cancer cells via suppression of survival signaling." *Oncotarget* 4(8): 1185-98.
- Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." *Nature* 407(6805): 784-8.
- Sawyer, A. (2014). "Complementary exercise and quality of life in patients with breast cancer." *Br J Nurs* 23 Suppl 16: S18-23.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." *EMBO J* 17(6): 1675-87.
- Scaffidi, C., I. Schmitz, et al. (1999). "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis." *J Biol Chem* 274(3): 1541-8.
- Schleich, K., U. Warnken, et al. (2012). "Stoichiometry of the CD95 death-inducing signaling complex: experimental and modeling evidence for a death effector domain chain model." *Mol Cell* 47(2): 306-19.

- Schmidt, T., B. Bartelt-Kirbach, et al. (2012). "Phosphorylation-dependent subcellular localization of the small heat shock proteins HspB1/Hsp25 and HspB5/alphaB-crystallin in cultured hippocampal neurons." *Histochem Cell Biol* 138(3): 407-18.
- Schmitt, E., A. Parcellier, et al. (2003). "Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant." *Cancer Res* 63(23): 8233-40.
- Schneider, P. (2000). "Production of recombinant TRAIL and TRAIL receptor: Fc chimeric proteins." *Methods Enzymol* 322: 325-45.
- Schneider, P., J. L. Bodmer, et al. (1997b). "Characterization of two receptors for TRAIL." *FEBS Lett* 416(3): 329-34.
- Schneider, P., D. Olson, et al. (2003). "Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)." *J Biol Chem* 278(7): 5444-54.
- Schneider, P., M. Thome, et al. (1997a). "TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB." *Immunity* 7(6): 831-6.
- Secchiero, P., C. Zerbinati, et al. (2004). "TRAIL promotes the survival, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells." *Cell Mol Life Sci* 61(15): 1965-74.
- Seckler, R. and R. Jaenicke (1992). "Protein folding and protein refolding." *FASEB J* 6(8): 2545-52.
- Sedger, L. M., M. B. Glaccum, et al. (2002). "Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice." *Eur J Immunol* 32(8): 2246-54.
- Seki, N., Y. Hayakawa, et al. (2003). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis is an important endogenous mechanism for resistance to liver metastases in murine renal cancer." *Cancer Res* 63(1): 207-13.
- Seki, T., H. Takahashi, et al. (2007). "Aggregate formation of mutant protein kinase C gamma found in spinocerebellar ataxia type 14 impairs ubiquitin-proteasome system and induces endoplasmic reticulum stress." *Eur J Neurosci* 26(11): 3126-40.
- Senft, J., B. Helfer, et al. (2007). "Caspase-8 interacts with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase to regulate cell adhesion and motility." *Cancer Res* 67(24): 11505-9.
- Seol, D. W., J. Li, et al. (2001). "Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis." *Cancer Res* 61(3): 1138-43.
- Shankar, S., T. R. Singh, et al. (2004). "Ionizing radiation enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer in vitro and in vivo: Intracellular mechanisms." *Prostate* 61(1): 35-49.
- Shaul, Y. D. and R. Seger (2007). "The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions." *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1213-26.
- Sheridan, J. P., S. A. Marsters, et al. (1997). "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors." *Science* 277(5327): 818-21.
- Shiozaki, E. N., J. Chai, et al. (2003). "Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9." *Mol Cell* 11(2): 519-27.
- Shirley, S. and O. Micheau (2010). "Targeting c-FLIP in cancer." *Cancer Lett* 332(2): 141-50.
- Shorter, J. (2011). "The mammalian disaggregase machinery: Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system." *PLoS One* 6(10): e26319.
- Shu, H. B., D. R. Halpin, et al. (1997). "Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis." *Immunity* 6(6): 751-63.
- Siegel, R. M., D. A. Martin, et al. (1998). "Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis." *J Cell Biol* 141(5): 1243-53.
- Siegelin, M. D., A. Habel, et al. (2009). "17-AAG sensitized malignant glioma cells to death-receptor mediated apoptosis." *Neurobiol Dis* 33(2): 243-9.
- Simonet, W. S., D. L. Lacey, et al. (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density." *Cell* 89(2): 309-19.
- Singh, R. and S. V. Torti (2013). "Carbon nanotubes in hyperthermia therapy." *Adv Drug Deliv Rev* 65(15): 2045-60.
- Singleton, A. B., M. Farrer, et al. (2003). "alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease." *Science* 302(5646): 841.
- Slee, E. A., M. T. Harte, et al. (1999). "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner." *J Cell Biol* 144(2): 281-92.
- Somasekharan, S. P., M. Koc, et al. (2013). "TRAIL promotes membrane blebbing, detachment and migration of cells displaying a dysfunctional intrinsic pathway of apoptosis." *Apoptosis* 18(3): 324-36.

- Song, C. W., H. J. Park, et al. (2005). "Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment." *Int J Hyperthermia* 21(8): 761-7.
- Song, J. H., M. C. Tse, et al. (2007). "Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand induced apoptotic and nonapoptotic signals in non small cell lung carcinoma cells." *Cancer Res* 67(14): 6946-55.
- Song, X., H. C. Kim, et al. (2012a). "Hyperthermia-enhanced TRAIL- and mapatumumab-induced apoptotic death is mediated through mitochondria in human colon cancer cells." *J Cell Biochem* 113(5): 1547-58.
- Song, X., S. Y. Kim, et al. (2012b). "The role of Bcl-xL in synergistic induction of apoptosis by mapatumumab and oxaliplatin in combination with hyperthermia on human colon cancer." *Mol Cancer Res* 10(12): 1567-79.
- Song, X., S. Y. Kim, et al. (2013b). "Evidence for two modes of synergistic induction of apoptosis by mapatumumab and oxaliplatin in combination with hyperthermia in human colon cancer cells." *PLoS One* 8(8): e73654.
- Song, X., S. Y. Kim, et al. (2013a). "Hyperthermia enhances mapatumumab-induced apoptotic death through ubiquitin-mediated degradation of cellular FLIP(long) in human colon cancer cells." *Cell Death Dis* 4: e577.
- Sopori, M. (2002). "Effects of cigarette smoke on the immune system." *Nat Rev Immunol* 2(5): 372-7.
- Speit, G. and P. Schutz "Hyperthermia-induced genotoxic effects in human A549 cells." *Mutat Res* 747-748: 1-5.
- Sprick, M. R., E. Rieser, et al. (2002). "Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8." *EMBO J* 21(17): 4520-30.
- Sprick, M. R., M. A. Weigand, et al. (2000). "FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2." *Immunity* 12(6): 599-609.
- Sreedhar, A. S., E. Kalmar, et al. (2004). "Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance." *FEBS Lett* 562(1-3): 11-5.
- Sreedharan, R., M. Riordan, et al. (2011). "The maximal cytoprotective function of the heat shock protein 27 is dependent on heat shock protein 70." *Biochim Biophys Acta* 1813(1): 129-35.
- Srinivasula, S. M., M. Ahmad, et al. (1997). "FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis." *J Biol Chem* 272(30): 18542-5.
- Srinivasula, S. M., R. Hegde, et al. (2001). "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." *Nature* 410(6824): 112-6.
- Stangl, S., M. Gehrmann, et al. (2011). "Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(2): 733-8.
- Stanhill, A., V. Levin, et al. (2006). "Ha-ras(val12) induces HSP70b transcription via the HSE/HSF1 system, but HSP70b expression is suppressed in Ha-ras(val12)-transformed cells." *Oncogene* 25(10): 1485-95.
- Stankiewicz, A. R., G. Lachapelle, et al. (2005). "Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation." *J Biol Chem* 280(46): 38729-39.
- Stanley, M. A., M. R. Pett, et al. (2007). "HPV: from infection to cancer." *Biochem Soc Trans* 35(Pt 6): 1456-60.
- Stefani, M. and C. M. Dobson (2003). "Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution." *J Mol Med (Berl)* 81(11): 678-99.
- Stennicke, H. R., J. M. Jurgensmeier, et al. (1998). "Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8." *J Biol Chem* 273(42): 27084-90.
- Stokoe, D., K. Engel, et al. (1992). "Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins." *FEBS Lett* 313(3): 307-13.
- Streich, F. C., Jr. and C. D. Lima (2014). "Structural and functional insights to ubiquitin-like protein conjugation." *Annu Rev Biophys* 43: 357-79.
- Stubbs, C. D. and A. D. Smith (1984). "The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function." *Biochim Biophys Acta* 779(1): 89-137.
- Sui, X., N. Kong, et al. (2014). "p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents." *Cancer Lett* 344(2): 174-9.
- Sun, X., L. Xing, et al. (2010). "The effect of mild temperature hyperthermia on tumour hypoxia and blood perfusion: relevance for radiotherapy, vascular targeting and imaging." *Int J Hyperthermia* 26(3): 224-31.
- Susin, S. A., E. Daugas, et al. (2000). "Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis." *J Exp Med* 192(4): 571-80.

- Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, et al. (2001). "Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(15): 8662-7.
- Szmigielski, S. (2013). "Cancer risks related to low-level RF/MW exposures, including cell phones." *Electromagn Biol Med* 32(3): 273-80.
- Tafani, M., D. A. Minchenko, et al. (2001). "Induction of the mitochondrial permeability transition mediates the killing of HeLa cells by staurosporine." *Cancer Res* 61(6): 2459-66.
- Taipale, M., D. F. Jarosz, et al. (2010). "HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(7): 515-28.
- Taiyab, A., A. S. Sreedhar, et al. (2009). "Hsp90 inhibitors, GA and 17AAG, lead to ER stress-induced apoptosis in rat histiocytoma." *Biochem Pharmacol* 78(2): 142-52.
- Takeda, K., M. J. Smyth, et al. (2002). "Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development." *J Exp Med* 195(2): 161-9.
- Takeda, K., M. J. Smyth, et al. (2001). "Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth." *Cell Immunol* 214(2): 194-200.
- Taso, C. J., H. S. Lin, et al. (2014). "The effect of yoga exercise on improving depression, anxiety, and fatigue in women with breast cancer: a randomized controlled trial." *J Nurs Res* 22(3): 155-64.
- Tavaria, M., T. Gabriele, et al. (1996). "A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family." *Cell Stress Chaperones* 1(1): 23-8.
- Tecchio, C., V. Huber, et al. (2004). "IFN α -stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells." *Blood* 103(10): 3837-44.
- Tenev, T., K. Bianchi, et al. (2011). "The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs." *Mol Cell* 43(3): 432-48.
- Tenev, T., A. Zachariou, et al. (2005). "IAPs are functionally non-equivalent and regulate effector caspases through distinct mechanisms." *Nat Cell Biol* 7(1): 70-7.
- Theodoraki, M. A. and A. J. Caplan (2012). "Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins." *Biochim Biophys Acta* 1823(3): 683-8.
- Theriault, J. R., H. Lambert, et al. (2004). "Essential role of the NH₂-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27." *J Biol Chem* 279(22): 23463-71.
- Thompson, J. F. and P. C. Kam (2008). "Current status of isolated limb infusion with mild hyperthermia for melanoma." *Int J Hyperthermia* 24(3): 219-25.
- Tillotson, B., K. Slocum, et al. (2010). "Hsp90 (heat shock protein 90) inhibitor occupancy is a direct determinant of client protein degradation and tumor growth arrest in vivo." *J Biol Chem* 285(51): 39835-43.
- Tinel, A. and J. Tschopp (2004). "The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress." *Science* 304(5672): 843-6.
- Tissieres, A., H. K. Mitchell, et al. (1974). "Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs." *J Mol Biol* 84(3): 389-98.
- Tolcher, A. W., M. Mita, et al. (2007). "Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1." *J Clin Oncol* 25(11): 1390-5.
- Tong, H., C. Lu, et al. (2009). "Role of caspase 8 as a determinant in trail sensitivity of neuroblastoma cell lines." *Pediatr Hematol Oncol* 26(8): 549-59.
- Tran, S. E., A. Meinander, et al. (2003). "Heat stress downregulates FLIP and sensitizes cells to Fas receptor-mediated apoptosis." *Cell Death Differ* 10(10): 1137-47.
- Trarbach, T., M. Moehler, et al. (2010). "Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer." *Br J Cancer* 102(3): 506-12.
- Trautinger, F., C. Kokesch, et al. (1997). "Overexpression of the small heat shock protein, hsp27, confers resistance to hyperthermia, but not to oxidative stress and UV-induced cell death, in a stably transfected squamous cell carcinoma cell line." *J Photochem Photobiol B* 39(1): 90-5.
- Truneh, A., S. Sharma, et al. (2000). "Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor." *J Biol Chem* 275(30): 23319-25.
- Tsugane, S. (2013). "[Tobacco smoking and cancer risk: epidemiological evidence]." *Nihon Rinsho* 71(3): 390-6.
- Ueffing, N., E. Keil, et al. (2008). "Mutational analyses of c-FLIP α , the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment." *Cell Death Differ* 15(4): 773-82.

- Ullenhag, G. J., A. Mukherjee, et al. (2007). "Overexpression of FLIPL is an independent marker of poor prognosis in colorectal cancer patients." *Clin Cancer Res* 13(17): 5070-5.
- Unno, K., H. Asakura, et al. (2002a). "Stress response caused by chronic alcohol intake in aged rat brain." *Alcohol Clin Exp Res* 26(7): 1017-23.
- Unno, M., T. Mizushima, et al. (2002b). "Structure determination of the constitutive 20S proteasome from bovine liver at 2.75 Å resolution." *J Biochem* 131(2): 171-3.
- Uversky, V. N. (2007). "Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation." *J Neurochem* 103(1): 17-37.
- Uversky, V. N. (2010). "Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins." *FEBS J* 277(14): 2940-53.
- Vabulas, R. M., S. Raychaudhuri, et al. (2010). "Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(12): a004390.
- Vagenende, V., M. G. Yap, et al. (2009). "Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol." *Biochemistry* 48(46): 11084-96.
- van der Sloot, A. M., V. Tur, et al. (2006). "Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the DR5 receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(23): 8634-9.
- van der Zee, J. (2002). "Heating the patient: a promising approach?" *Ann Oncol* 13(8): 1173-84.
- van Engeland, M., H. J. Kuipers, et al. (1997). "Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis." *Exp Cell Res* 235(2): 421-30.
- van Loo, G., M. van Gurp, et al. (2002). "The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity." *Cell Death Differ* 9(1): 20-6.
- Vankayala, R., C. C. Lin, et al. (2014). "Gold nanoshells-mediated bimodal photodynamic and photothermal cancer treatment using ultra-low doses of near infra-red light." *Biomaterials* 35(21): 5527-38.
- Varma, S., R. Myerson, et al. (2012). "Simultaneous radiotherapy and superficial hyperthermia for high-risk breast carcinoma: a randomised comparison of treatment sequelae in heated versus non-heated sectors of the chest wall hyperthermia." *Int J Hyperthermia* 28(7): 583-90.
- Vasilevskaya, I. A. and P. J. O'Dwyer (2005). "17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin overcomes TRAIL resistance in colon cancer cell lines." *Biochem Pharmacol* 70(4): 580-9.
- Vela, L., O. Gonzalo, et al. (2013). "Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation." *J Biol Chem* 288(7): 4935-46.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, et al. (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." *Cell* 102(1): 43-53.
- Verhagen, A. M., J. Silke, et al. (2002). "HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins." *J Biol Chem* 277(1): 445-54.
- Vidair, C. A., R. N. Huang, et al. (1996). "Heat shock causes protein aggregation and reduced protein solubility at the centrosome and other cytoplasmic locations." *Int J Hyperthermia* 12(5): 681-95.
- Vineis, P., A. Schatzkin, et al. (2010). "Models of carcinogenesis: an overview." *Carcinogenesis* 31(10): 1703-9.
- von Pawel, J., J. H. Harvey, et al. (2014). "Phase II Trial of Mapatumumab, a Fully Human Agonist Monoclonal Antibody to Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 1 (TRAIL-R1), in Combination With Paclitaxel and Carboplatin in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer." *Clin Lung Cancer* 15(3): 188-196 e2.
- Voss, O. H., S. Batra, et al. (2007). "Binding of caspase-3 prodomain to heat shock protein 27 regulates monocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 proteolytic activation." *J Biol Chem* 282(34): 25088-99.
- Waelter, S., A. Boeddrich, et al. (2001). "Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation." *Mol Biol Cell* 12(5): 1393-407.
- Wagner, K. W., E. A. Punnoose, et al. (2007). "Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL." *Nat Med* 13(9): 1070-7.
- Wajant, H., J. Gerspach, et al. (2013). "Engineering death receptor ligands for cancer therapy." *Cancer Lett* 332(2): 163-74.
- Wajant, H., F. J. Johannes, et al. (1998). "Dominant-negative FADD inhibits TNFR60-, Fas/Apo1- and TRAIL-R/Apo2-mediated cell death but not gene induction." *Curr Biol* 8(2): 113-6.
- Walczak, H., M. A. Degli-Esposti, et al. (1997). "TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL." *EMBO J* 16(17): 5386-97.
- Walczak, H., R. E. Miller, et al. (1999). "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo." *Nat Med* 5(2): 157-63.
- Walker, N. P., R. V. Talanian, et al. (1994). "Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer." *Cell* 78(2): 343-52.

- Wang, J., H. J. Chun, et al. (2001). "Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 13884-8.
- Wang, P., J. Zhang, et al. (2007a). "Inhibition of RIP and c-FLIP enhances TRAIL-induced apoptosis in pancreatic cancer cells." *Cell Signal* 19(11): 2237-46.
- Wang, Q., X. Wang, et al. (2006a). "PKCdelta-mediated regulation of FLIP expression in human colon cancer cells." *Int J Cancer* 118(2): 326-34.
- Wang, T. T. and J. Jeng (2000). "Coordinated regulation of two TRAIL-R2/KILLER/DR5 mRNA isoforms by DNA damaging agents, serum and 17beta-estradiol in human breast cancer cells." *Breast Cancer Res Treat* 61(1): 87-96.
- Wang, W. (2005). "Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics." *Int J Pharm* 289(1-2): 1-30.
- Wang, X., R. A. Herr, et al. (2007b). "Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3." *J Cell Biol* 177(4): 613-24.
- Wang, X., W. Ju, et al. (2006b). "17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin synergistically potentiates tumor necrosis factor-induced lung cancer cell death by blocking the nuclear factor-kappaB pathway." *Cancer Res* 66(2): 1089-95.
- Wang, Y., B. Zhang, et al. (2008). "Bcl-xL prevents staurosporine-induced hepatocyte apoptosis by restoring protein kinase B/mitogen-activated protein kinase activity and mitochondria integrity." *J Cell Physiol* 215(3): 676-83.
- Wang, Y. Y., S. X. Lin, et al. (2013). "Clinical efficacy of CyberKnife combined with chemotherapy and hyperthermia for advanced non-small cell lung cancer." *Mol Clin Oncol* 1(3): 527-530.
- Wassenaar, T. A., W. J. Quax, et al. (2008). "The conformation of the extracellular binding domain of Death Receptor 5 in the presence and absence of the activating ligand TRAIL: a molecular dynamics study." *Proteins* 70(2): 333-43.
- Wei, M. C., T. Lindsten, et al. (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c." *Genes Dev* 14(16): 2060-71.
- Welch, W. J. and J. P. Suhan (1986). "Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress." *J Cell Biol* 103(5): 2035-52.
- Westphal, D., G. Dewson, et al. (2010). "Molecular biology of Bax and Bak activation and action." *Biochim Biophys Acta* 1813(4): 521-31.
- Wiborg, O., M. S. Pedersen, et al. (1985). "The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences." *EMBO J* 4(3): 755-9.
- Wiezorek, J., P. Holland, et al. (2010). "Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer." *Clin Cancer Res* 16(6): 1701-8.
- Wiley, S. R., K. Schooley, et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." *Immunity* 3(6): 673-82.
- Wilkie-Grantham, R. P., S. Matsuzawa, et al. (2013). "Novel phosphorylation and ubiquitination sites regulate reactive oxygen species-dependent degradation of anti-apoptotic c-FLIP protein." *J Biol Chem* 288(18): 12777-90.
- Wilkinson, J. M. and M. J. Stevens (2014). "Use of complementary and alternative medical therapies (CAM) by patients attending a regional comprehensive cancer care centre." *J Complement Integr Med* 11(2): 139-45.
- Wilkinson, K. D., V. L. Tashayev, et al. (1995). "Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T." *Biochemistry* 34(44): 14535-46.
- Willis, S. N., L. Chen, et al. (2005). "Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins." *Genes Dev* 19(11): 1294-305.
- Wu, G. S. (2009). "TRAIL as a target in anti-cancer therapy." *Cancer Lett* 285(1): 1-5.
- Xi, L. F., L. A. Koutsky, et al. (2009). "Relationship between cigarette smoking and human papilloma virus types 16 and 18 DNA load." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(12): 3490-6.
- Xu, G. and S. R. Jaffrey (2013). "Proteomic identification of protein ubiquitination events." *Biotechnol Genet Eng Rev* 29: 73-109.
- Xu, P., D. M. Duong, et al. (2009). "Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation." *Cell* 137(1): 133-45.
- Xu, Z., K. Graham, et al. (2013). "14-3-3 protein targets misfolded chaperone-associated proteins to aggresomes." *J Cell Sci* 126(Pt 18): 4173-86.
- Yamada, H., S. Tada-Oikawa, et al. (1999). "TRAIL causes cleavage of bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB cells." *Biochem Biophys Res Commun* 265(1): 130-3.
- Yamaguchi, H. and H. G. Wang (2001). "The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change." *Oncogene* 20(53): 7779-86.

- Yang, J. K., L. Wang, et al. (2005). "Crystal structure of MC159 reveals molecular mechanism of DISC assembly and FLIP inhibition." *Mol Cell* 20(6): 939-49.
- Yang, R. C., H. C. Jao, et al. (2004). "The essential role of PKC α in the protective effect of heat-shock pretreatment on TNF α -induced apoptosis in hepatic epithelial cell line." *Exp Cell Res* 296(2): 276-84.
- Yang, S., A. D. Thor, et al. (2006). "Caspase-3 mediated feedback activation of apical caspases in doxorubicin and TNF- α induced apoptosis." *Apoptosis* 11(11): 1987-97.
- Yerbes, R., A. Lopez-Rivas, et al. (2012). "Control of FLIP(L) expression and TRAIL resistance by the extracellular signal-regulated kinase1/2 pathway in breast epithelial cells." *Cell Death Differ* 19(12): 1908-16.
- Yonezawa, M., T. Otsuka, et al. (1996). "Hyperthermia induces apoptosis in malignant fibrous histiocytoma cells in vitro." *Int J Cancer* 66(3): 347-51.
- Yoo, J., H. R. Kim, et al. (2006). "Hyperthermia enhances tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in human cancer cells." *Int J Hyperthermia* 22(8): 713-28.
- Yoo, J. and Y. J. Lee (2007). "Effect of hyperthermia on TRAIL-induced apoptotic death in human colon cancer cells: development of a novel strategy for regional therapy." *J Cell Biochem* 101(3): 619-30.
- Yoo, J. and Y. J. Lee (2008). "Effect of hyperthermia and chemotherapeutic agents on TRAIL-induced cell death in human colon cancer cells." *J Cell Biochem* 103(1): 98-109.
- Yoshida, T., T. Shiraishi, et al. (2007). "Glycosylation modulates TRAIL-R1/death receptor 4 protein: different regulations of two pro-apoptotic receptors for TRAIL by tunicamycin." *Oncol Rep* 18(5): 1239-42.
- Younes, A., J. M. Vose, et al. (2010). "A Phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma." *Br J Cancer* 103(12): 1783-7.
- Yue, H. H., G. E. Diehl, et al. (2005). "Loss of TRAIL-R does not affect thymic or intestinal tumor development in p53 and adenomatous polyposis coli mutant mice." *Cell Death Differ* 12(1): 94-7.
- Zamai, L., M. Ahmad, et al. (1998). "Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells." *J Exp Med* 188(12): 2375-80.
- Zavialov, A., R. Benndorf, et al. (1998). "The effect of the intersubunit disulfide bond on the structural and functional properties of the small heat shock protein Hsp25." *Int J Biol Macromol* 22(3-4): 163-73.
- Zerafa, N., J. A. Westwood, et al. (2005). "Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies." *J Immunol* 175(9): 5586-90.
- Zhang, S., H. M. Shen, et al. (2005). "Down-regulation of c-FLIP contributes to the sensitization effect of 3,3'-diindolylmethane on TRAIL-induced apoptosis in cancer cells." *Mol Cancer Ther* 4(12): 1972-81.
- Zhang, X., L. Zhang, et al. (2007). "c-Fos as a proapoptotic agent in TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells." *Cancer Res* 67(19): 9425-34.
- Zhang, X. R., L. Y. Zhang, et al. (2003). "Reciprocal expression of TRAIL and CD95L in Th1 and Th2 cells: role of apoptosis in T helper subset differentiation." *Cell Death Differ* 10(2): 203-10.
- Zhao, L., P. Yue, et al. (2012). "mTOR complex 2 is involved in regulation of Cbl-dependent c-FLIP degradation and sensitivity of TRAIL-induced apoptosis." *Cancer Res* 73(6): 1946-57.
- Zheng, S. J., J. Jiang, et al. (2004). "Reduced apoptosis and ameliorated listeriosis in TRAIL-null mice." *J Immunol* 173(9): 5652-8.
- Zhu, Y. J., H. Lin, et al. (2000). "Fresh and nonfibrillar amyloid beta protein(1-40) induces rapid cellular degeneration in aged human fibroblasts: evidence for AbetaP-channel-mediated cellular toxicity." *FASEB J* 14(9): 1244-54.
- Zhuang, H., W. Jiang, et al. (2010). "Down-regulation of HSP27 sensitizes TRAIL-resistant tumor cell to TRAIL-induced apoptosis." *Lung Cancer* 68(1): 27-38.
- Zhuang, H., W. Jiang, et al. (2013). "Suppression of HSP70 expression sensitizes NSCLC cell lines to TRAIL-induced apoptosis by upregulating DR4 and DR5 and downregulating c-FLIP-L expressions." *J Mol Med (Berl)* 91(2): 219-35.
- Zimmerman, S. B. and S. O. Trach (1991). "Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*." *J Mol Biol* 222(3): 599-620.
- Zou, H., Y. Li, et al. (1999). "An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." *J Biol Chem* 274(17): 11549-56.
- Zou, H., R. Yang, et al. (2003). "Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP." *J Biol Chem* 278(10): 8091-8.
- Zwickl, P., D. Voges, et al. (1999). "The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354(1389): 1501-11.